

Aus dem

Med. Zentrum für Operative Medizin, Klinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss von Testosteron auf die Expression
der TGF- betas in testikulären
Sertolizellen und Keimzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Juliane Corinna Ney

aus Stralsund

Marburg, 2014

Aus dem

Med. Zentrum für Operative Medizin, Klinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss von Testosteron auf die Expression
der TGF- betas in testikulären
Sertolizellen und Keimzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Juliane Corinna Ney

aus Stralsund

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: PD Dr. L. Konrad

1. Korreferent: Prof. Dr. R. Jacob

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	7
EINLEITUNG	11
DIE HODENFUNKTION	11
Die Spermatogenese	11
Stadien der Spermatogenese	13
HORMONELLE REGULATION DER SPERMATOGENESE	15
Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis	15
Struktur und Wirkmechanismus von Testosteron.....	16
Die Rolle von Testosteron bei der Spermatogenese	17
TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA.....	19
Struktur	19
Rezeptor und Signaltransduktion.....	19
Biologische Effekte der TGF-betas	21
ZUSAMMENHANG TESTOSTERON UND TGF- β	21
TGF- β im Rattenhoden.....	21
TGF- β Sekretion im Hoden unter hormoneller Veränderung	23
TGF- β Sekretion während der Prostataentwicklung	24
TGF- β Sekretion in der Prostata unter hormoneller Veränderung	24
ZIELSETZUNG	26
MATERIAL UND METHODEN.....	28
MATERIAL.....	28
Zellen	28
Geräte.....	30
Materialien	31
Medien, Chemikalien, Lösungen	31

METHODEN	34
Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen	34
Zellkulturversuche	37
Messung der TGF- β Sekretion	42
Histologische Methoden	44
Statistische Auswertungen	47
ERGEBNISSE	48
SEKRETION DER TGF-BETAS VON TESTIKULÄREN ZELLEN	48
Untersuchung der TGF- β 1, - β 2 und - β 3 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron	48
Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2 Sekretion von SK11 Zellen unter dem Einfluss von Testosteron	52
INHIBITION DER TESTOSTERONWIRKUNG DURCH FLUTAMID	58
Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid	58
Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2- Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid	62
IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DES ANDROGEN- REZEPTORS UND TGF- β 2 IM MENSCHLICHEN HODEN	67
Untersuchung des Androgenrezeptors	67
Immunhistochemische Untersuchung von TGF- β 2 im Hoden	73
DISKUSSION	83
EFFEKTE VON TESTOSTERON AUF DIE SEKRETION DER TGF-BETAS IN TESTIKULÄREN ZELLEN	84
ANALYSE DER AR UND TGF- β 2 LOKALISATION BEI INFERTILEN PATIENTEN	90
ZUSAMMENFASSUNG	96
LITERATURVERZEICHNIS	100
ANHANG	117

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
A.dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
AP-1	Activator Protein 1
AR	Androgen Antikörper
ARA-	AR-associated proteins
ARE	Androgen responsive element
ARKO	Androgen Rezeptor Knock out
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Zellen
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ctrl	Kontrolle
d	dies/ Tag
DAB	Diamino-benzidin
DBD	DNA Binding Domain
DHT	Dihydrotestosteron

DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent acid
Ets	E-twenty six (Familie von Transkriptionsfaktoren, zuerst als transduziertes Gen vom Leukämievirus E26)
FKS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FSH-R	Follikel stimulierendes Hormon Rezeptor
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
h	hours/ Stunden
HDAC	Histon Deacetylase
HE	Hämatoxylin Eosin
HPV	humaner Papilloma Virus
LAP	Latency associated peptide
LBD	Ligand Binding Domain
LC	Leydig Zellen
LH	Luteinisierendes Hormon
LIM	Lin-11, Isl-1 und Mec-3 ("Zink Finger")
LNCaP	Lymph Node of Carcinoma of the Prostate
MAD	mothers against decapentaplegic

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MH1	MAD homology 1
MH2	MAD homology 2
min	Minuten
MIS	Mullerian- inhibitory substance
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
p	Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung (Signifikanz)
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Peritubulärzellen
PCA	Prostata Carcinom
PCARKO	Peritubulärzell spezifischer Androgen Rezeptor knock out
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SBE	Smad binding elements
SC	Sertoli-Zellen
SCARKO	Serolizell spezifischer Androgen Rezeptor knock out
SD	Standard deviation/ Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean

SGP	Sulfated Glycoproteine
SMAD	Signalübertragungsprotein; Abkürzung ist Fusion aus Nematoden Genen SMA 2, 3 und 4 sowie MAD
Spc	Spermatocyten
Spd	Spermatiden
Spg	Spermatogonien
T	Testosteron
TAD	Transactivation Domain
TGF- β	Transforming growth factor - β
T β R I-III	Transforming growth factor - β Rezeptor I-III

EINLEITUNG

DIE HODENFUNKTION

Die Hodenfunktion unterteilt sich in einen exokrinen und endokrinen Anteil. Beim exokrinen Anteil handelt es sich um das germinative Tubulusepithel. In der Wand der Hodenkanälchen werden von basalwärts zum Lumen hin aus Spermatogonien über die Spermatozyten I. und II. Ordnung Spermatiden gebildet. Aus diesen gehen schließlich die Spermatozoen hervor. Dieser gesamte Prozess wird Spermatogenese genannt (Merkle et al. 1997). Beim endokrinen Teil handelt es sich um die Leydigzellen im interstitiellen Kompartiment der Tubuli seminiferi (Abb. 1). Hier wird das Androgen Testosteron sezerniert, welches durch die Blut-Hoden-Schranke in die Hodentubuli wandert und dort die Spermatogenese unterhält. Beide Hodenteilfunktionen, der exokrine und endokrine Anteil, werden durch einen übergeordneten hormonellen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, gesteuert und regeln sich durch einen Rückmeldemechanismus (Feedback) selbst (Merkle et al. 1997). Im Folgenden möchte ich genauer auf die Spermatogenese eingehen.

Die Spermatogenese

Bei der Spermatogenese entwickeln sich aus primären männlichen Keimzellen ($2n$) haploide Samenzellen ($1n$) (Leblond & Clermont, 1952). Die Spermatogenese lässt sich in drei Phasen einteilen:

1. Proliferation der Stammzellen,
2. Meiose und
3. Spermio-genese mit Ausreifung der Spermatozoen.

Durch mitotische Teilungen werden aus den Typ-A-Spermatogonien in der Proliferationsphase Intermediär- und B-Spermatogonien (Monesi 1962, 1965). Die B-Spermatogonien ruhen bis zum Beginn der Pubertät und differenzieren sich dann zu primären Spermatocyten (Spermatocyten I), die in die Meiose eintreten. Die Meiose besteht aus einer Reduktionsteilung, der Meiose I, und einer mitotischen Teilung, der Meiose II. Vor Beginn der Meiose I wird der DNA-Gehalt der Spermatozyten I verdoppelt ($4n$). Dadurch sind sie die größten Zellen des Keimepithels. An der Konfiguration ihrer Kerne kann man die unterschiedlichen Stadien der Prophase der Meiose I (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese) erkennen:

- Leptotän: Kondensation der Chromosomen
- Zygotän: Paarung der homologen Chromosomen im synaptonemalen Komplex
- Pachytän: Austausch homologer Chromatiden-Abschnitte zwischen den gepaarten Chromosomen mittels „crossing over“
- Diplotän: Trennung der homologen Chromosomen
- Diakinese: Ende der RNA-Synthese, Auflösen der Zellkernhülle

Nachdem das Diplotän-Stadium durchlaufen ist, ist die erste Reifeteilung mit Entstehung von zwei sekundären Spermatocyten (Spermatocyten II ($2n$)) abgeschlossen. Durch eine sehr kurze Interphase sind die Zellen sehr klein und schwierig zu identifizieren. Nun schliesst sich die zweite meiotische Teilung an, die ähnlich wie eine Mitose verläuft. Während der Teilungsphasen (Metaphase II, Anaphase II und Telophase II) werden die Chromatiden jedes Chromosoms voneinander getrennt, so dass die resultierenden runden Spermatiden haploid ($1n$) sind. Während der letzten Phase der Keimzellentwicklung, der Spermiogenese, entstehen aus den runden Spermatiden durch Chromatinkondensation und Elongation reife Spermatozoen (Abb. 1, de Kretser & Kerr, 1988; Russell et al. 1990).

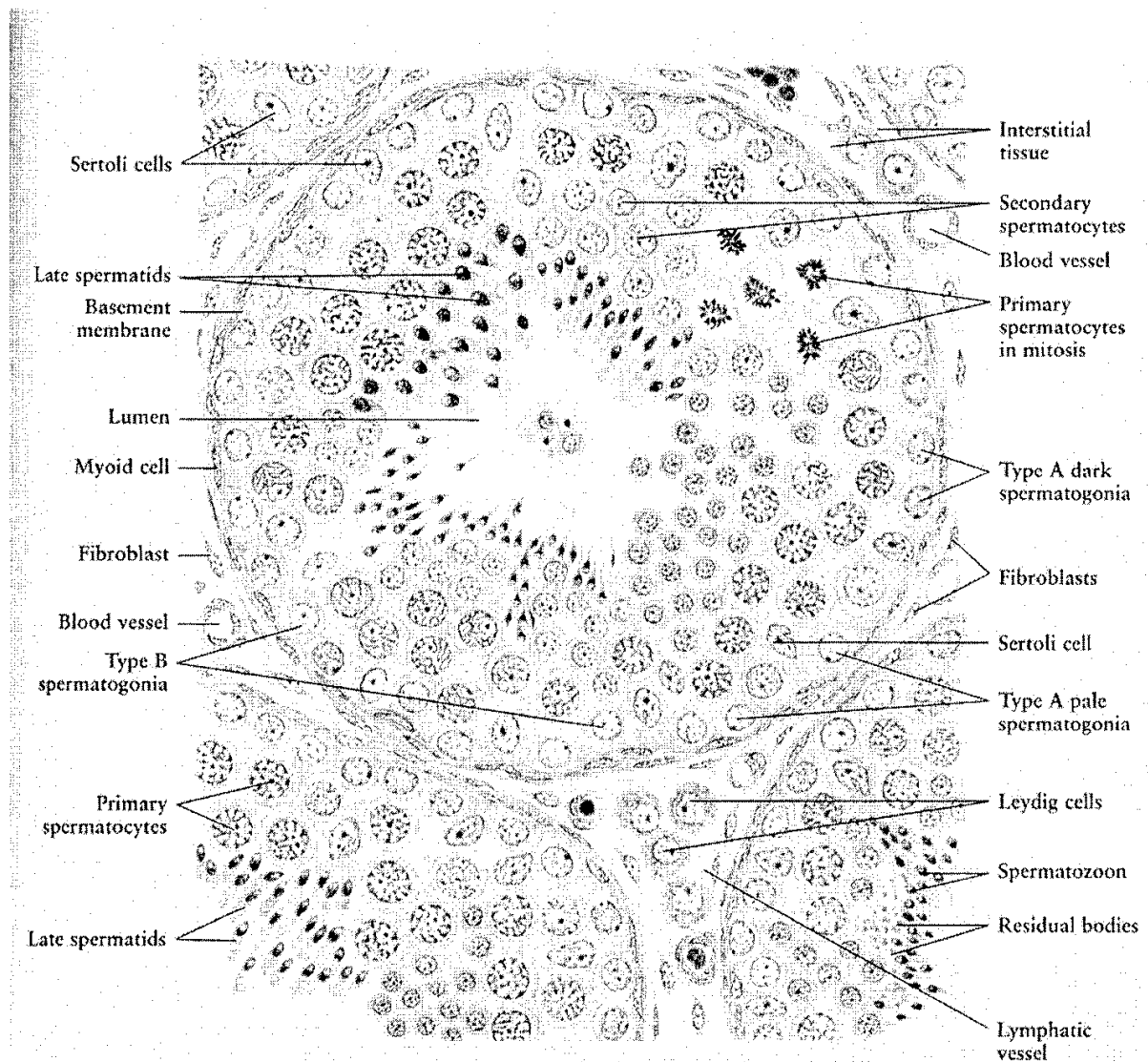


Abb.1: Ausschnitt aus einem Tubulus seminiferus (Zhang S 1999)

Stadien der Spermatogenese

Die drei zuvor beschriebenen Entwicklungsphasen der Spermatogenese (Proliferation, Meiose, Spermiogenese) sind im Tubulus seminiferus der Ratte in bestimmter

Charakteristik gruppiert, den Stadien der Spermatogenese (Abb. 2). Die Stadien sind in Längsrichtung des Keimepithels regelmäßig hintereinander angeordnet. Dies wird als „spermatogenetische Welle“ bezeichnet (Perey et al. 1961). Die verschiedenen Stadien des Keimepithels entwickeln sich in einem Zyklus. Jedes Stadium hat eine speziesspezifische konstante Dauer. Der komplette Zyklus einer Ratte benötigt 12 Tage und umfasst 14 Stadien. Nach Beendigung des Stadiums XIV folgt erneut das Stadium I. Der gesamte spermatogenetische Prozess einer Ratte dauert 56,4 Tage (Leblond & Clermont, 1952; Weinbauer & Wessels, 1999).

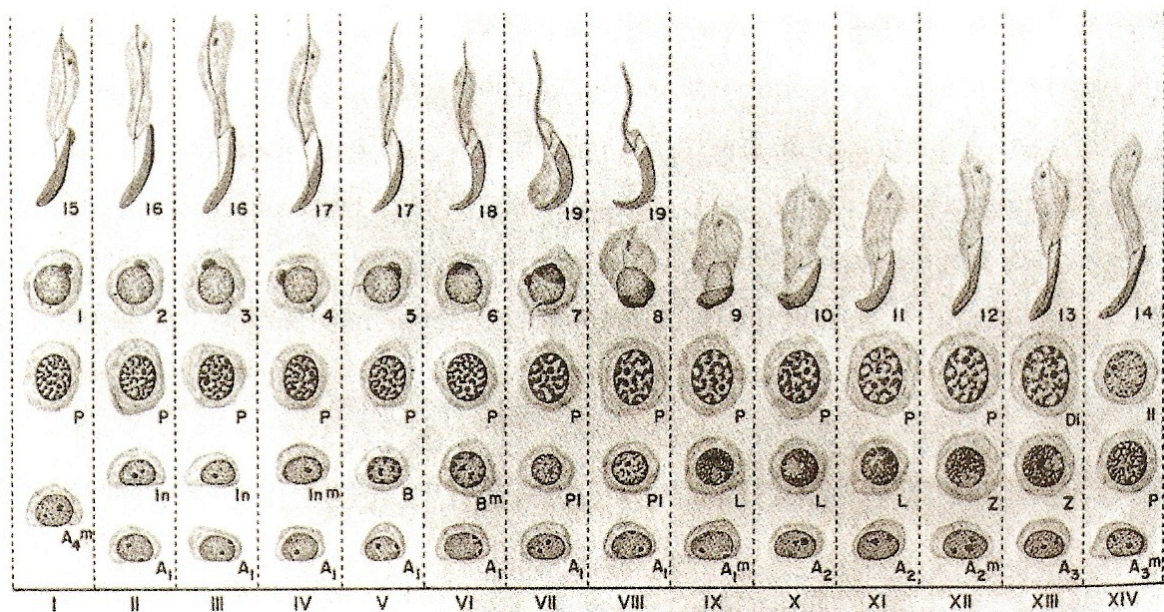


Abb.2: Zelluläre Zusammensetzung der 14 Stadien des Differenzierungszyklus am Keimepithel der Ratte. Jede Säule ist mit einer römischen Ziffer gekennzeichnet und stellt die zellulären Bestandteile dar, die an einer bestimmten Stelle im Querschnitt eines Tubulus zu finden sind. **A:** A-Spermatogonien; **In:** Intermediär-Spermatogonien; **B:** B-Spermatogonien; **PI:** ruhende Preleptotän-Spermatocyten; **L:** aktive Preleptotän-Spermatocyten; **Z:** Zygotän-Spermatocyten; **P:** Pachytän-Spermatocyten; **Di:** Diplotän-Spermatocyten; **II:** Spermatozoen II. Ordnung; arabische Ziffern bezeichnen Spermatozoen in verschiedenen Differenzierungsabschnitten der Spermiogenese. Die Definition der Stadien erfolgt nach Leblond & Clermont (1952).

HORMONELLE REGULATION DER SPERMATOGENESE

Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis

Das Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) ist ein Dekapeptid, das in einem pulsatilen Rhythmus vom Hypothalamus sezerniert wird. Über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem induziert es im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung der beiden Gonadotropine Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). FSH wirkt auf die Sertoli-Zellen im Hodentubulus, woraufhin diese das Glykoprotein Inhibin produzieren. LH induziert in den Leydigzellen im interstitiellen Kompartiment die Bildung von Testosteron. Der Inhibin-Serumspiegel hat einen starken inhibierenden Effekt (negatives Feedback) auf die FSH-Produktion in der Hypophyse. Der Testosteron-Serumspiegel senkt ebenso über negative Rückkopplung die LH-Produktion in der Hypophyse als auch die GnRH-Sekretion im Hypothalamus und damit die LH- und FSH-Ausschüttung (Guyton & Hall, 2000). Damit inhibieren Testosteron und Inhibin den eigenen Produktionsweg und gewährleisten so einen Stopp bei übermäßiger Hormonsekretion. Testosteron, das über die Blut-Hoden-Schranke in die Tubuli seminiferi zu den Sertoli-Zellen gelangt, wirkt dort positiv auf die Spermatogenese (Abb. 3, Merkle et al. 1997).

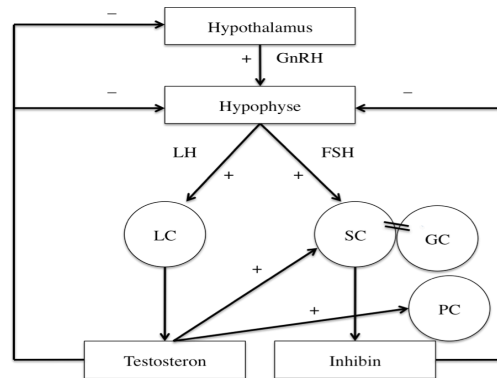


Abb.3: Hypothalamisch-Hypophysärer Regelkreis. **GnRH:** Gonadotropin Releasing Hormone; **LH:** Luteinisierendes Hormon; **FSH:** Follikel stimulierendes Hormon; **LC:** Leydig-Zellen; **SC:** Sertoli-Zellen; **GC:** Keimzellen

Struktur und Wirkmechanismus von Testosteron

Testosteron ist ein androgenes Steroidhormon, das über den Androgenrezeptor (AR) seine Wirkung entfaltet. Der Androgenrezeptor ist ein Steroidrezeptor, der zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört. Diese sind intrazelluläre Rezeptoren, die für die Signaltransduktion der Steroidhormone in der Zelle verantwortlich sind (Germain et al. 2006). Der 110-kDa Zink-Finger-Transkriptionsfaktor (AR) wird durch Phosphorylierung aktiviert (Kuiper & Brinkmann, 1995) und nach Ligandbindung dimerisiert. Auf nukleärer Ebene bindet AR an androgenresponsive Elemente in der Promotorregion androgen-regulierter Gene. Die AR-vermittelte Transkription ist durch viele Proteine reguliert, wie z.B. ARA₇₀ (Yeh & Chang, 1996) oder ARA₁₆₀ (Hsiao & Chang, 1999) zusammen mit "cAMP-response element-binding protein" (Fronsdal et al. 1998), AP-1 (Gittes 1991; Bubulya et al. 1996) und Ets (Schneikert et al. 1996). Die wachsende Liste kürzlich entdeckter AR Transkriptions-Co-Regulatoren unterstützt die Vermutung, dass dieses komplexe Netzwerk verschiedenster Signale die androgen-vermittelte Transkription positiv und negativ reguliert.

Die Rolle von Testosteron bei der Spermatogenese

Der Androgenrezeptor wird in Leydig-, Sertoli- und Peritubulärzellen exprimiert, aber vermutlich nicht in Keimzellen. Während einige Arbeitsgruppen eine AR-Expression in einem oder mehreren Keimzellstadien zeigten (Galena et al. 1974; Wright & Frankel 1980; Vornberger et al. 1994; Zhou et al. 1996), konnten andere Arbeitsgruppen dies nicht belegen (Grootegeod et al. 1977; Anthony et al. 1989, Bremner et al. 1994, Shan et al. 1997). Zur Untersuchung der Wirkung von Testosteron auf die Spermatogenese wurden verschiedene Modelle entwickelt: zum Einen die Inaktivierung des AR, AR-„Knock-out“ (ARKO), die Inaktivierung von AR nur in Sertoli-Zellen (SC) (SCARKO) und nur in Peritubulärzellen (PC) (PCARKO) und zum Anderen die Ausschaltung von GnRH mittels Gendefekt als auch eine massive Reduktion von intratestikulärem Testosteron.

Beim ARKO-Modell fehlt die Testosteronwirkung ebenfalls in androgensensitivem Gewebe, wodurch der Phänotyp dem Androgen-Resistenz-Syndrom entspricht, das bedeutet ein weibliches soziales Geschlecht bei männlichem Geschlechtschromosomenmuster (Wilson 1992; Quigley et al. 1995; Yeh et al. 2002). Durch den fehlenden Testosteroneinfluss kommt es zum Malescensus testis (Kryptorchismus), weshalb die Spermatogenese bereits geschädigt wird und ein selektiver Einfluss von Testosteron nur bedingt beurteilbar ist.

Beim SCARKO-Modell verläuft die externe Geschlechtsentwicklung normal. Allerdings ist in der Spermatogenese bei regelrechter Spermatogonienzahl die Zahl der Spermatocyten halbiert, runde Spermatiden sind kaum vorhanden und elongierte Spermatiden fehlen völlig (De Gendt et al. 2004; Chang et al. 2004). Dies lässt schlussfolgern, dass die Sertoli-Zell-vermittelte Androgenwirkung für die vollständige Spermatogenese essentiell und die Vollendung der Meiose mit Entstehung haploider Zellen testosteronabhängig ist, wie es schon Johnston et al. (2001) beschrieben haben. Schlussendlich wurde mit dem SCARKO-Modell die Abwesenheit von AR in

Keimzellen bewiesen, da die Spermatogenese ansonsten erhalten bliebe. Im PCARKO-Modell kommt es zur Oligozoospermie (< 20 Mio. Spermatozoen pro ml) bei erhaltener Fertilität. Das bedeutet, dass auch die PC bei der Vermittlung der Testosteronwirkung auf die Spermatogenese eine Rolle spielen (Zhang et al. 2006).

In der gendefekten hypogonadalen Maus mit einer GnRH-Defizienz (hpg-Maus) ist die Spermatogenese im Stadium der pachytänen Spermatocyten arretiert. Nach Testosteronsubstitution nimmt die Keimzahl in der hpg-Maus jedoch dosisabhängig zu und die Spermatogenese ist qualitativ wiederhergestellt (Singh et al. 1995).

Nach massiver intratestikulärer Testosteronreduktion kommt es zur Keimzahlminderung und Ausbleiben der Elongation der Spermatiden, was nach Testosteronsubstitution vollständig reversibel ist (Mc Lachlan et al. 1994). Dies lässt vermuten, dass Testosteron besonders für die Spermiogenese unabkömmlich ist. Auch O'Donnell et al. (1994) zeigten, dass die Konversion von Spermatiden zwischen den Stadien VII und VIII testosteronabhängig ist. Kerr et al. (1993) führten dies auf die Testosteronabhängigkeit der Sertolizell-Membrankomplexe zurück, was gleichzeitig bedeutet, dass der Sertoli-Keimzell-Kontakt während der Elongation androgenabhängig ist.

Zusammenfassung:

- Meiose und Spermiogenese sind testosteronabhängig
- Peritubulärzellen dienen ebenfalls der Vermittlung der Testosteronwirkung in der Spermatogenese
- Nur allein mit Testosteron (ohne FSH) läuft die Spermatogenese qualitativ vollständig ab

TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA

Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) sind eine Gruppe von multifunktionalen Cytokinen, die zum ersten mal wegen ihrer transformierenden Wirkung auf Rattenfibroblasten beschrieben und benannt wurden (Roberts & Sporn, 1985). Sie wirken auto-, para- und endokrin und sind fähig die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und eine weite Vielfalt von zellulären Aktivitäten zu beeinflussen (Massague & Wotton 2000).

Struktur

Es existieren drei TGF- β -Isoformen (TGF- β 1, - β 2, - β 3) bei den Säugetieren. TGF- β ist ein hoch konserviertes Protein und liegt als Homodimer vor (Griffith et al. 1996, Taipale et al. 1998). Über die Aminosäuresequenz der Proteine definiert TGF- β eine Gruppe verwandter Proteine, die zur TGF- β -Superfamilie zusammengefasst werden. Zu den Mitgliedern dieser Superfamilie gehören das bone morphogenetic protein (BMP), Inhibin, Activin, "decapentaplegic Vg-related proteins", Dorsalin, Nodal, "Mullerian-inhibiting substance" (MIS), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und "glial-cell-derived neutropic factor" (Massague & Wotton, 2000). TGF- β wird in einer inaktiven Form produziert, die jedoch mittels Säurebehandlung, Hitze oder Proteolyse durch Thrombospondin-1 aktiviert werden kann (Lawrence et al. 1984, Murphy-Ullrich & Poczatek 2000). Die Inaktivierung beruht auf einer kovalenten Bindung mit einem "latency associated peptide" (LAP), das die Rezeptorbindungsstelle maskiert. TGF-betas sind ubiquitär vorkommend, daher muss ihre Bioverfügbarkeit über komplexe Mechanismen streng reguliert sein (Roberts, 1998).

Rezeptor und Signaltransduktion

Das aktivierte TGF- β vermittelt seine Wirkung über drei verschiedene Rezeptoren. Diese drei unterschiedlichen TGF- β -Rezeptoren lauten T β RI, T β RII und T β RIII.

T β RI und T β RII sind Transmembranserin-/threoninkinasen. Die initiale Bindung von TGF β -1 und TGF β -3 erfolgt über T β RII, welcher mit T β RI assoziiert ist und diesen phosphoryliert (de Caestecker 2004). TGF- β 2 bindet hingegen an den akzessorischen Rezeptor T β RIII (membranverankertes Proteoglykan), welcher daraufhin mit T β RII interagiert, um T β RI zu aktivieren und die letztendliche Signaltransduktion mittels der Smadmoleküle zu vermitteln (Rotzer et al. 2001). Kürzlich wurde beschrieben, dass neben TGF- β 1 und TGF- β 3 auch TGF- β 2 an ein alternatives Spleißprodukt des T β RII-Gens bindet, das vor allem in Osteoblasten und mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Die Rezeptorisoform T β RIIB bindet TGF- β 2 also auch in Abwesenheit von T β RIII und aktiviert daraufhin T β RI, welcher die Smad-Signaltransduktion initiiert (Rotzer et al. 2001). Allerdings existiert T β RIIB nur in wenigen Spezies und kann somit kein universeller Rezeptor für TGF- β 2 sein (Konrad et al. 2007). Auf Endothelzellen binden TGF- β 1 und TGF- β 3 an Endoglin (Cheifetz et al. 1992). Auf dem TGF- β -Signalweg werden intrazellulär Smad2/Smad3, die mit Smad4 assoziiert sind, aktiviert. Dieser Komplex transloziert in den Nucleus und wirkt dort als Transkriptionsaktivator (ten Dijke & Hill 2004). Smads agieren zum einen mit dem Transkriptions-Co-Aktivator CBP/p300 (Massague 1998) und zum anderen mit DNA-bindenden Proteinen, wie Fos/Jun (Zhang et al. 1998, Feng & Derynck, 2005, Derynck et al. 1998).

Smads sind unterteilt in drei Subklassen basierend auf ihrer Struktur und Funktion (Massague & Wotton 2000). R-Smads (Smad 2 und 3) werden direkt von T β RI aktiviert und bilden dann einen Komplex mit dem Partner Smad4/DPC4, dem Co-Smad. Dieser Komplex wird in den Nucleus internalisiert (Hahn et al. 1996). Die inhibitorischen Smads 6 und 7 (I-Smads) werden durch Ligandenstimulation hervorgerufen (Afrakhte et al. 1998) und behindern die Rezeptoraktivierung (Imamura et al. 1997, Hayashi et al. 1997) oder den R-Smad/Co-Smad-Komplex (Hata et al. 1998).

Anfangs glaubte man, die Smads wären die einzigen Substrate des TGF- β Rezeptors und deren einzige intrazelluläre Mediatoren. Einige Studien berichteten jedoch, dass TGF- β und BMPs auch mit dem MAPK Signalweg interagieren.

Biologische Effekte der TGF-betas

TGF-betas haben viele unterschiedliche Wirkungen in verschiedenen Geweben. Zahlreiche Studien zeigen, dass TGF-betas wichtige Regulatoren von Überleben, Apoptose und Morphogenese von Keimzellen sind (Skinner & Moses 1989, Olaso et al. 1998a, Konrad et al. 2006). Generell inhibieren TGF-betas das Wachstum von epithelialen, endothelialen, hämatopoetischen, neuronalen und lymphoiden Zellen und stimulieren das Wachstum mesenchymaler Zellen (Moses et al. 1985, Chambaz et al. 1996, Taipale et al. 1998). Außerdem beeinflussen TGF-betas die Zelldifferenzierung (Keski-Oja et al. 1987), fördern die Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen (Ignotz & Massague 1986), wirken in manchen Zelltypen chemotaktisch (Postlethwaite et al. 1987) und immunsuppressiv auf die T_{Helfer}-Zellen (Taipale et al. 1998).

ZUSAMMENHANG TESTOSTERON UND TGF- β

TGF- β im Rattenhoden

TGF- β 1 wird in pubertären und adulten Sertoli-Zellen und Keimzellen exprimiert, mit einem Anstieg in Spermatozyten und runden Spermatiden der Stufen VIII und IX (Teerds & Dorrington 1993). Auch in Leydigzellen des pubertären Stadiums ist eine TGF- β 1-Expression nachgewiesen, die in adulten Leydigzellen jedoch nur noch sehr schwach ausgeprägt ist (Teerds & Dorrington 1993, Santamaria et al. 1995). TGF- β 2 ist in adulten Leydigzellen, runden und elongierten Spermatiden der Stadien V-IX lokalisiert, jedoch nicht in Sertoli-Zellen während der Spermatogenese (Teerds &

Dorrington JH 1993). Eine Expression von TGF- β 3 wurde in adulten Sertoli-Zellen, Spermatozyten und runden Spermatiden der Stadien V-X gefunden (Lui et al. 2003a).

Der TGF- β Rezeptor T β RI ist in Leydigzellen, pachytänen Spermatocyten, runden Spermatiden und elongierten Spermatiden der Stadien VII-XIV lokalisiert (Olaso et al. 1998b). T β RII befindet sich in Sertoli-Zellen und Keimzellen beginnend mit Spermatogonien, pachytänen Spermatozyten und stärkerer Expression in runden und elongierten Spermatiden der Stadien I-X (Olaso et al. 1998b). Die in situ Hybridisierung zeigt außerdem mRNA des TGF- β -Rezeptors T β RIII in Spermatozyten und runden Spermatiden des adulten Rattenhodens (MacConell et al., 2002).

TGF- β -Peptide üben unterschiedliche Funktionen im Hoden aus. Sie kontrollieren die Steroidogenese in fetalen und adulten Leydigzellen (Benahmed et al. 1989, Gautier et al. 1997), die Keimzellanzahl (Olaso et al. 1998a, Prepin & Le Vigouroux 1997, Donovan 1994), die Extrazellulärmatrixsynthese (Panthou et al. 1994), die Sertoli-Zell-tight-junction-Formation beim Aufbau der Blut-Hoden-Schranke (Lui et al. 2001, Lui et al. 2003b) und die Zell-Zell-Interaktion zwischen Sertoli-Zellen und Myoidzellen (Ailenberg et al. 1990). Sie spielen also eine Rolle bei der Morphogenese des Hodens (Skinner & Moses, 1989; Konrad et al. 2000; Memon et al. 2008). Ausserdem sind sie im Hoden an Induktion (Tachibana et al. 1997, Jang et al. 2002, Valderrama-Carvajal et al. 2002) und Inhibition (Huang et al. 2000, Chin et al. 1999, Shin et al. 2001) der Apoptose beteiligt, abhängig vom zellulären und molekularen Kontext.

Generell nimmt die TGF- β 1 und - β 2-Expression im pubertären Hoden kontinuierlich ab, während die TGF- β 3-Konzentration mit dem Beginn der Pubertät einen Höhepunkt erreicht und danach erst abfällt. Wegen der zeitlichen Übereinstimmung des TGF- β 3-Konzentrationspeaks und dem Beginn der Spermatogenese lässt sich die Vermutung aufstellen, TGF- β 3 könnte bei der Initiation der Spermatogenese involviert sein

(Mullaney & Skinner, 1993). Auch wegen der oben beschriebenen stadien-spezifischen TGF- β Expression und der Lokalisierung der TGF- β -Rezeptoren in Sertoli- und Keimzellen lässt sich vermuten, dass die TGF-betas auf noch ungeklärte Art und Weise an der Regulation der Spermatogenese beteiligt sind.

TGF- β Sekretion im Hoden unter hormoneller Veränderung

Um die Regulation der TGF-betas, zum Beispiel auf hormoneller Ebene, besser zu verstehen, wurden Versuche durchgeführt. Mullaney & Skinner (1993) isolierten epithelial-ähnliche Sertolizellen aus dem prä-, mittel-, und postpubertären Rattenhoden und stimulierten diese mit Follikel stimulierendem Hormon. Dabei kam es zu einer drastischen Reduktion der TGF- β 2 Sekretion. Ein Effekt auf die TGF- β 1 und β 3 Sekretion war nicht erkennbar (Mullaney & Skinner, 1993).

Maire et al. (2005) verabreichten Ratten in utero das Antiandrogen Flutamid und untersuchten anschließend den adulten Hoden. Dabei wurde eine Inhibition der TGF- β Liganden, -rezeptoren T β RI und T β RII und Smads 1, 2, 3, und 5 festgestellt und eine Überexpression von Smad7 beobachtet. Diese Veränderungen könnten an der verstärkten Apoptose von Keimzellen unter Androgenentzug beteiligt sein (Maire et al. 2005).

Nachdem TGF- β 1 in der ventralen Prostata als androgen-hemmendes und proapoptotisches Protein identifiziert wurde (Kyprianou & Isaacs, 1989), untersuchten Desai & Kondaiah (2000) die TGF- β Expression in akzessorischen Sexualorganen der Ratte nach Orchiektomie und anschließender Testosteronsubstitution. Die TGF- β 1 und - β 2 Expression in Nebenhoden und Samenblase nahm nach Orchiektomie zu und wurde nach Testosteroninjektion deutlich supprimiert. Dies war für TGF- β 3 nicht so deutlich erkennbar (Desai & Kondaiah, 2000).

TGF- β Sekretion während der Prostataentwicklung

Die TGF- β Expression während der Entwicklung der Prostata, untersucht an der Ratte, variiert. Während die TGF- β 1 mRNA Expression konstant bleibt, steigt die TGF- β 2 mRNA Sekretion in der Prostata bei Geburt an, um anschließend abzunehmen und im Alter von 100 Tagen erneut anzusteigen. Die TGF- β 3 mRNA Expression während der Pubertät und in jungem Erwachsenenalter ist hingegen hoch, um anschließend am Tag 100 abzunehmen. Das bedeutet zusammengefasst, dass sich die TGF- β 2 und - β 3 Sekretion während der Entwicklung der Prostata entgegengesetzt verhalten und anscheinend unterschiedlich reguliert sind (Itoh et al. 1998). Testosteron- und EGF-stimuliertes stromales und epitheliales Zellwachstum während der Prostataentwicklung wird durch TGF- β inhibiert (Itoh et al. 1998).

TGF- β Sekretion in der Prostata unter hormoneller Veränderung

Nach Kastration 60 Tage alter Ratten steigt die TGF- β 1 und - β 2 mRNA Expression an. Die TGF- β 3 mRNA Expression wird nach Kastration interessanterweise signifikant supprimiert (Itoh et al. 1998). Im Gegensatz zu den in vivo Beobachtungen zeigt Testosteron jedoch keinen Effekt auf die TGF- β Expression prostaticer Zellen in Kultur. Unter dem Vorbehalt einer seltenen Androgenabhängigkeit von Zellen in Kultur, lässt sich vermuten, dass der zuvor beschriebene Effekt durch ein komplexes Netzwerk verschiedenster Wachstumsfaktoren reguliert sein muss und nicht vereinfacht auf den Androgenentzug zurückzuführen ist (Itoh et al. 1998).

In unterschiedlichen Studien wurde beschrieben, dass Androgene einen negativen Effekt auf den TGF- β 1-Liganden (Kyprianou & Isaacs 1989; Zatelli et al. 2000) und die Rezeptorexpression (Kyprianou & Isaacs 1988; Wikstrom et al. 1999) als auch Smad-Expression- und Aktivierung (Brodin et al. 1999) in der maturen Prostata haben. Weitere Studien berichten, dass AR mit Smad3 assoziiert und dies entweder die AR-

vermittelte Transkription verstärkt (Kang et al. 2001) oder inhibiert (Hayes et al. 2001). Chipuk et al. (2001) beschreiben zum ersten mal in einem in vitro-Experiment mit humanen Prostata-Adenocarcinom Zellen (LNCaP), dass 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) den TGF- β -Signalweg in epithelialen Zellen der Prostata durch Interaktion von AR mit Smad3 inhibiert. Sie unterstützen die These, dass Androgene den TGF- β -Signalweg durch Assoziation von AR mit Smad3 blockieren, da dadurch die Bindung von Smad3 mit "Smad-binding elements" (SBE) im TGF- β -verantwortlichen Promoter inhibiert ist (Chipuk et al. 2001). Dies wird ebenfalls von Wang et al. (2004) beschrieben. Sie zeigen auf, dass das AR-assoziierte Protein 55 (ARA55/Hic-5) den TGF- β -Signalweg selektiv durch Interaktion seiner LIM-Domäne mit der MH2-Domäne von Smad3 unterbricht (Wang et al. 2004).

Die LIM-Domäne ist eine Proteinstruktur bestehend aus zwei Zink-Finger-Domänen, die durch zwei hydrophobe Aminosäurereste getrennt sind (Kadmas & Beckerle 2004). Sie ist nach ihrer initialen Entdeckung in den Proteinen Lin11, Isl-1 und Mec-3 benannt worden (Bach 2000). Die LIM-Domäne spielt eine Rolle in der cytoskelettalen Organisation, der Organentwicklung und Onkogenese. Sie vermittelt Protein-Protein Interaktionen, die unerlässlich für zelluläre Prozesse sind (Bach 2000).

Die MH2-Domäne befindet sich in der Struktur der SMADs am C-terminalen Ende. Sie ist verantwortlich für die Rezeptorerkennung und Oligomerisation mit anderen SMADs und DNA-Bindung. Sie interagiert direkt mit der MH1 Domäne der R-SMADs (Roelen et al. 2003).

Aktuelle Studien berichten außerdem, dass DHT die TGF- β vermittelte Apoptose von Prostata-Krebs-Zellen mittels Interaktion von AR mit Smad4 in den LNCaP T β RII-positiven Zellen verstärken (Zhu et al. 2008). Es zeigt sich, dass TGF- β eine AR-vermittelte Transkriptionsaktivierung in zwei Androgen-sensitiven Promotoren (probasin und prostatich spezifisches Antigen-PSA) induziert und die TGF- β 1- und PSA-Expression durch DHT verstärkt wird (Kang et al. 2001, Zhu et al. 2008). Bereits

in klinischen Studien wurde die Beobachtung gemacht, dass ein erhöhter TGF- β 1-Spiegel im Plasma mit einem erhöhtem PSA im Serum korreliert (Adler et al. 1999).

Hayes et al. (2001) beschreiben jedoch exakt das Gegenteil. Sie sind der Meinung, dass Smad3 die AR-vermittelte Transkriptionsaktivierung am MMTV- und PSA-Promotor inhibiert. Diese Inhibition ist demnach durch Smad4 verstärkbar und durch Smad7 verringerbar (Hayes et al. 2001). Auch van der Poel zeigt, dass die AR-Expression die TGF- β 1/Smad Transkriptionsaktivität und die Wachstumsinhibition von TGF- β 1 verringert (van der Poel 2005).

Kang et al. (2002) beobachten wiederum, dass Smad4 und Smad3 mit dem Androgenrezeptor interagieren, wobei die Transfektion von Smad3 in PC3- und LNCaP Zellen die AR-vermittelte Transkriptionsaktivität erhöht und die Co-Transfektion von Smad3 und Smad4 verringert. Zusammenfassend lässt sich annehmen, dass die Interaktionen zwischen AR, Smad3 und Smad4 aus einer unterschiedlichen Regulation der AR-Transaktivierung resultieren (Kang et al. 2002).

ZIELSETZUNG

Mit dem Eintritt in die Pubertät, während der ersten spermatogenetischen Welle, kommt es zu einer massiven Keimzellapoptose, die für eine später funktionierende Spermatogenese essentiell ist (Rodriguez et al. 1997). Dies wird vermutlich unter anderem durch TGF- β getriggert (Konrad et al. 2006). In der Prostata kommt es nach Androgenentzug zur Apoptose (Maire et al. 2005). Die Apoptose in der Prostata wird vermutlich ebenfalls durch einen gleichzeitigen Anstieg der TGF-betas bedingt. Dies ließ uns die Hypothese ableiten, dass Testosteron eine inhibierende Wirkung auf die Sekretion der TGF-betas haben könnte bzw. eine Testosteronreduktion positiv auf die TGF- β -Sekretion wirkt.

Von mehreren Gruppen wurde vermutet, TGF- β habe eine essentielle Rolle in der Initiation und Ablauf der Spermatogenese. Die Regulationsmechanismen der Spermatogenese sind bisher nur ansatzweise verstanden. Daher war die Zielsetzung meiner Arbeit eine eventuelle Regulation von TGF- β durch Testosteron aufzudecken und diese in einen Zusammenhang mit den Wirkmechanismen der Spermatogenese zu stellen. Damit sollte ein kleiner Anteil zur Klärung der Wirkmechanismen der Spermatogenese beigetragen werden und in naher Zukunft infertilen Männern verbesserte Therapiemöglichkeiten bei Kinderwunsch gegeben werden.

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

Zellen

WL3 Zellen

Sertoli-ähnliche Zellen wurden von C57BL/6 Mäusen isoliert und mit dem humanen Papilloma Virus (HPV) Subtyp E6 und E7 (pLXSN-HPV E6/7) immortalisiert. Beide Subtypen tragen ein Gen, das eine Neomycinresistenz codiert und damit eine Selektion mit G418 erlaubt. Die Zellen wurden vermehrt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die Zellen antworten auf östrogene Stimuli und exprimieren den Östrogen-R β Rezeptor (ER- β) und den Androgenrezeptor (Mueller & Korach 2001).

SK11 Zellen

Die Sertoli-Zelllinie (SK11) wurde von *H-2K^b-tsA58* transgenen Mäusen etabliert, die ein induzierbares Temperatur-sensitives SV40T Antigen in ihrer Keimbahn tragen (Walther et al. 1996). Bei der Isolierung der Tubuli seminiferi, wurden die Leydig-Zellen entfernt und weiteres Gewebe dispergiert und die Zellen suspendiert. Anschließend wurden klonale Kolonien gezüchtet und kultiviert. Alle Zelllinien exprimieren Sertoli-Zellprodukte, wie α -inhibin, "Steel factor", Sulfated Glycoprotein 2 (SGP-2), Transferrin, den Androgenrezeptor und den "orphan nuclear receptor" SF-1 (Sneddon et al. 2005). Selektierte Zelllinien zeigten mittels Immunhistochemie ebenfalls die Expression Sertoli-Zell-spezifischer Zytoskelettmarker. Die Expression des FSH-Rezeptors besteht ebenfalls in einigen Zelllinien. In wenigen Zelllinien existiert ausserdem eine geringe Expression des Lutein-Hormonrezeptors. Nur in einem kleinen Teil der Zelllinien wurde das Gen für den Transkriptionsfaktor GATA-1, welcher spezifisch in Sertoli-Zellen exprimiert wird, nachgewiesen (Walther et al. 1996).

Wir benutzten Sertoli-Zellen (SK11) mit der Expression des AR, jedoch exprimierten diese keinen FSH-Rezeptor.

GC2 Zellen

Bei den GC2 Zellen handelt es sich um eine Keimzelllinie, die aus dekapsulierten Hoden sechs Wochen alter BALB/c Mäuse isoliert wurde (Hofmann et al. 1994). Die testikulären Keimzellen der Mäuse wurden mit dem Plasmid für den "Simian Virus 40 Large Tumor Antigen Gen (LTA_g)", und dem Plasmid, das eine Temperatur-sensitive (ts) Mutante des p53 Gen enthält, ko-transfiziert. Damit ist das LTA_g bei einer Temperatur von 39°C und Inaktivität des p53 Proteins noch immer zur Immortalisierung fähig. Bei einer Temperatur von 37°C oder 32°C hingegen würde p53 aktiv und den proliferativen Effekt des viralen Proteins neutralisieren, um es den Zellen zu ermöglichen sich zu differenzieren. Die Zelllinie exprimiert, spezifisch für Keimzellen, das Laktatdehydrogenase C₄ Isoenzym und Cytochrom c_i Isoform (Hofmann et al. 1994).

Testikuläre Biopsien

Unter dem Verdacht einer Störung in der Spermatogenese wurden insgesamt 35 Männern, deren Identität uns unbekannt ist, in Paraffin eingebettete testikuläre Biopsien zur Verfügung gestellt (Vet Anatomie Universität Gießen, Hodendatenbank von Prof. Dr. M. Bergmann).

Geräte

- Brutschrank, Hera Cell Heraeus, Hanau
- Brutschrank, Mini Galaxy E RS Biotech, Irvine
UK
- Hitzekocher, MultiGourmet Braun
- Mikroskop Axiovert 200 Carl Zeiss,
München mit AxioCam MRc (Farbversion) und Computersoftware MRGrab
1.0
- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Lamin Air) Heraeus, Hanau
- Pipetus-Akku Hirschmann
- Stickstoffbehälter (-196°C) Uniklinikum
Marburg
- Vortexer Merck Eurolab,
Darmstadt
- Wasserbad, W12 Medingen
- Zentrifuge, Labofuge 400R Heraeus, Hanau
- Zentrifuge, Biofuge pico Heraeus, Hanau
- 96 Well-Plate Reader, Benchmark Reader Bio-Rad, München
und Software Microplate® Manager Version 5.1

Materialien

- Abdeckfolien EASYseal™
- Cryo Tube™ vials Nunclon™
- Falcons 10 ml Cellstar Tubes Greiner bio-one
- Kulturflaschen 25 cm², Tissue Culture Flasks Cellstar Greiner bio-one
- Kulturflaschen 75 cm² sterile, non-pyrogenic, human DNA-free, DNase and RNase-free Greiner Bio
- Pipetten Eppendorf
- Pipettenaufsätze 5/10/25 ml sterile Tipp Greiner bio-one
- Zählkammer 0,0025mm² Neubauer
- 24-Well-Plate, Multiwell™ 24 Well Falcon
- 96 Well-Plate Nunclon™
- 96 Well-Plate Nunclon™ Surface

Medien, Chemikalien, Lösungen

Hier wird der Großteil der Medien, Chemikalien und Lösungen aufgeführt. Ausstehende Reagenzien, wie gekaufte Kits, genaue Medienzusammenstellung oder Antikörper, sind direkt bei den Versuchen ergänzt.

MATERIAL UND METHODEN

10x "Phosphate Buffered Saline" (PBS) pH 7,4	0,01M KH_2PO_4
von Roche, (Mannheim)	0,1M Na_2HPO_4
	1,37M NaCl
	0,027M KCl
MAYERS Hämalaun (in 1000ml Aqua dest. gelöst)	1,0g Hämatoxylin (Merck)
	0,2g Natriumjodat (Merck)
	50g Kalialaun (Merck)
	50g Chloralhydrat (Merck)
	1,0g Zitronensäure
EOSIN (in 100ml Aqua dest. gelöst)	1,0g Eosin (Merck)
	1 Tropfen Essigsäure
Alfazym 100ml	PAA, Cölbe
Amphotericin B 250µg/ml	PromoCell, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Dade Behring, Marburg
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell PA	Promega, Madison USA
"Complete Mini", Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche, Mannheim
DMEM/HG Medium (1:1)	PAA, Cölbe
DMEM/ Ham's F-12 Medium (1:1)	PAA, Cölbe

MATERIAL UND METHODEN

DAKO® Antibody Diluent	DAKO, Carpinteria USA
DAKO® Liquid DAB+Substrate-Chromogen Solution	DAKO, Carpinteria USA
DMSO 20%	Molecular Probes®
Entellan®	Merck
Ethanol vergällt, 100%, 96%, 80%, 70%	Apotheke Marburg
Ethanol, absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Fetales Kälberserum „GOLD“ (FKS)	PAA, Cölbe
Flutamide	Sigma, Saint Louis USA
Natriumhydroxid (NaOH 1M)	Uniklinikum Marburg
Magermilchpulver 2%	Fluka
Penicillin (100u/ml)/Streptomycin (0,1mg/ml)	PAA, Cölbe
1x Phosphate Buffered Saline (PBS) & Mg 500ml	Dulbecco, Cölbe ohne Ca
Salzsäure (HCl 1M)	Uniklinikum Marburg
"Target Retrieval Solution" 1:10 pH 6,1	DAKO
Testosterone-DEA Schedule III, 288.43M (anhyd.)	Sigma
Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma
Tween 20	ICN Biochemicals
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 3%	Uniklinikum Marburg

Xylol

Merck, Darmstadt

Entionisiertes, steriles und analysenreines Wasser wurde mit Hilfe einer Reinstwasseranlage (Sartorius, Göttingen) hergestellt und wird im folgenden immer mit A. dest. bezeichnet.

METHODEN

Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen

Beim Umgang mit Zellen ist es wichtig auf sauberes Arbeiten und Keimfreiheit zu achten. Dazu wurden alle Arbeiten mit den Zellen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom getätigt. Zuvor wurden die Hände und alle unter der Sicherheitswerkbank befindlichen Gegenstände mit 70% Ethanol desinfiziert. Um eventueller Keimbesiedlung an den Rändern der Mediumflaschen zu begegnen, wurden die Flaschenränder nach dem Öffnen unter der Sicherheitswerkbank abgeflammt. Allen Zellkulturmedien wurden zur Prophylaxe von Bakterien- und Pilzbefall Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B hinzugefügt. Zusätzlich wurden zum Schutz vor Kontamination gestopfte Pipetten verwendet und zusätzlich Handschuhe und Mundschutz getragen.

Alle Zellen wurden in Medium mit 10% fötalem Kälberserum bei 34° kultiviert. Die WL3 Zellen erhielten DMEM/F12 Medium, die SK11- und GC2 Zellen erhielten DMEM/HG Medium. Die Atmosphäre des Brutschranks enthielt 5% CO₂. Zum Waschen der Zellen wurde calcium- und magnesiumfreies, steriles PBS verwendet. Vor Gebrauch wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Auftauen von Zellen

Der Auftauprozess muss schnellstmöglich geschehen. Dazu wurden die Zellen im Kryocup aus dem Stickstoffbehälter entnommen und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in ein Falcon mit 25ml des entsprechenden Mediums pipettiert und acht bis zehn Minuten bei 48 x g zentrifugiert. Damit wurde das DMSO, das zwar eine Kristallbildung der Zellen beim Einfrieren vorbeugt, jedoch zytotoxisch ist, entfernt. Das überschüssige Medium über dem oftmals makroskopisch sichtbarem Pellet am Grund des Falcons wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 1ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Zum Anwachsen wurden die resuspendierten Zellen vorzugsweise zusammen mit 8 bis 10ml Medium in eine 25cm² Zellkulturflasche pipettiert. Ein Mediumwechsel erfolgte frühestens zwei bis drei Tagen nach Aussaat, um den Zellen das Anwachsen auf der Kulturflasche zu ermöglichen.

Mediumwechsel

Das Medium wurde möglichst vollständig mit der Pipette abgesaugt, die Zellen mit Zellkultur-PBS bedeckt und geschwenkt, dieses wiederum abgesaugt und frisches Medium in die Kulturflasche pipettiert.

Passagieren der Zellen

Zum Passagieren wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen mit Zellkultur-PBS gewaschen und dieses wiederum abgezogen. Anschließend wurden 500µl bis 2ml Alfazym hinzugegeben und die Zellen 5 bis 8 min im Brutschrank bei 34°C inkubiert. Wenn sich die Zellen bei leichtem Klopfen von der Platte lösten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10-25ml Medium abgestoppt, das Medium mit den Zellen in ein Falcon überführt und bei 48 x g für 8 bis 10 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml Medium resuspendiert und in den gewünschten Verdünnungen in die neuen Zellkulturflaschen pipettiert.

Zellzählung

Nach Passagieren, Zentrifugieren und Resuspension des Zellpellets in 1ml Medium wurde eine 1:10 Verdünnung (10µl Zellsuspension mit 90µl Medium) hergestellt und in die Neubauer Zählkammer gefüllt. Anschließend wurden die Zellen in 8 Feldern der Zählkammer gezählt, der Mittelwert bestimmt und die Zellzahl in der Ausgangssuspension mit folgender Formel errechnet: $\text{Mittelwert} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ Zellsuspension. Der Verdünnungsfaktor des Mediums wurde anschließend durch Multiplikation mit 10 herausgerechnet werden.

Einfrieren der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden passagiert und 10min bei 48 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900µl Medium resuspendiert und in ein Kryocup gegeben, das 2 bis 3 h im Kühlschrank auf 4°C heruntergekühlt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900µl 20% DMSO (1:5 mit Medium verdünnt), um die Eiskristallbildung der Zellen beim Einfrieren zu verhindern. Dann wurden die Zellen mindestens über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um das langsame Abkühlen bei -80°C zu ermöglichen, wurde das Kryocup in Alufolie gewickelt.

Zellkulturversuche

Stimulation mit Testosteron

Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis sie in den Kulturflaschen konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen passagiert und 50.000 Zellen der jeweiligen Zellart (WL3, SK11 und GC2) in 10% FKS-Medium (WL3 in DMEM/F12 und SK11 bzw. GC2 in DMEM/HG) auf eine 24 Loch-Platte gegeben und für 24h im Brutschrank bei 34°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die SK11- und GC2 Zellen mit Testosteron (jeweils 10^{-9}M , 10^{-8}M und 10^{-7}M) stimuliert; eine unstimulierte Kontrolle zum Vergleich wurde belassen. Dabei wurde den SK11- und GC2-Zellen das FKS im Medium abrupt auf 1% FKS reduziert. Da die WL3 Zellen bei diesem schnellen FKS-Entzug starben, wurde es stufenweise vor Beginn der Testosteronstimulation reduziert. So setzten wir 24h nach Aussaat der WL3 Zellen dem Medium 5% FKS zu, 48h nach Aussaat nur noch 2,5% FKS und 72h nach Aussaat konnte die Testosteronstimulation (jeweils 10^{-9}M , 10^{-8}M und 10^{-7}M) in 1% FKS begonnen werden. Auch hier wurde eine unstimulierte Kontrolle zum Vergleich belassen. Alle Zellen inkubierten 72h mit Testosteron ohne Mediumwechsel im Brutschrank bei 34°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der jeweiligen Zellart abgenommen und in ein Eppendorf-Hütchen pipettiert. In einer 1:7 Verdünnung wurde zusätzlich in Zellkultur-PBS gelöstes Complete Mini zur Inhibition von Proteasen hinzugegeben, das Hütchen geschüttelt, kurz abzentrifugiert und bei -20°C zur späteren TGF-beta-Messung mittels ELISA eingefroren.

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellen unter Testosteron und Vergleichsmöglichkeit der später zu bestimmenden TGF-beta Sekretion der Zellen durch rechnerische Gleichstellung der Zellzahl wurde anschließend ein Proliferationsassay bei allen drei Zellarten durchgeführt. Nachdem die Medienüberstände aus den Vertiefungen abpipettiert wurden, wurden die Zellen mit

Zellkultur-PBS gewaschen und 500µl FKS-freies Medium (WL3 in DMEM/F12 und SK11 bzw. GC2 in DMEM/HG) hinzugegeben. Dann wurde pro Vertiefung 100µl "Cell Titer" als photometrisch messbarer Farbindikator hinzugefügt und dies für 3h im Brutschrank bei 34°C inkubiert. Wichtig war dabei in jeweils einer Vertiefung ohne Zellen der 24-Loch-Platte auch FKS-freies Medium mit dem "Cell Titer" wie beschrieben zu inkubieren, um eine Kontrolle zur Standardisierung zu haben. Nach 3h wurden 3 mal 100µl des jeweiligen, mit Farbstoff, umgesetzten Mediums der drei unterschiedlichen Zellarten und die Kontrolle auf eine 96-Loch-Platte zur photometrischen Messung bei 540nm/695nm pipettiert (Abb.4 und Abb.5).

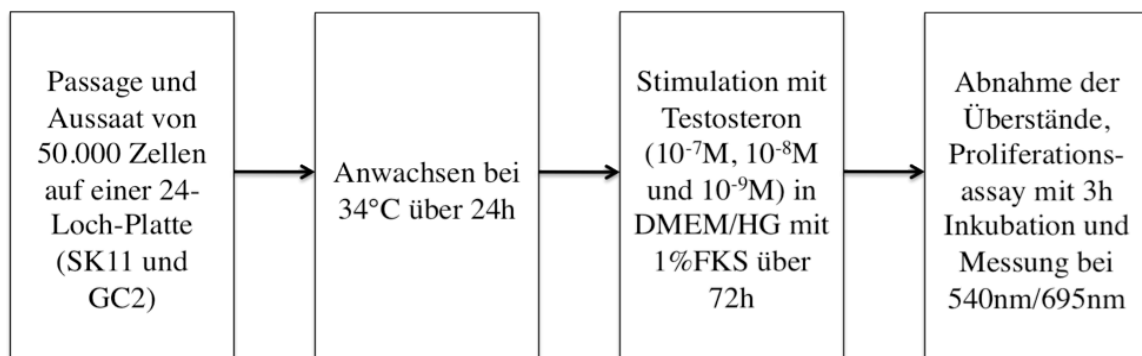


Abb.4: Modell Testosteronversuch bei SK11- und GC2-Zellen

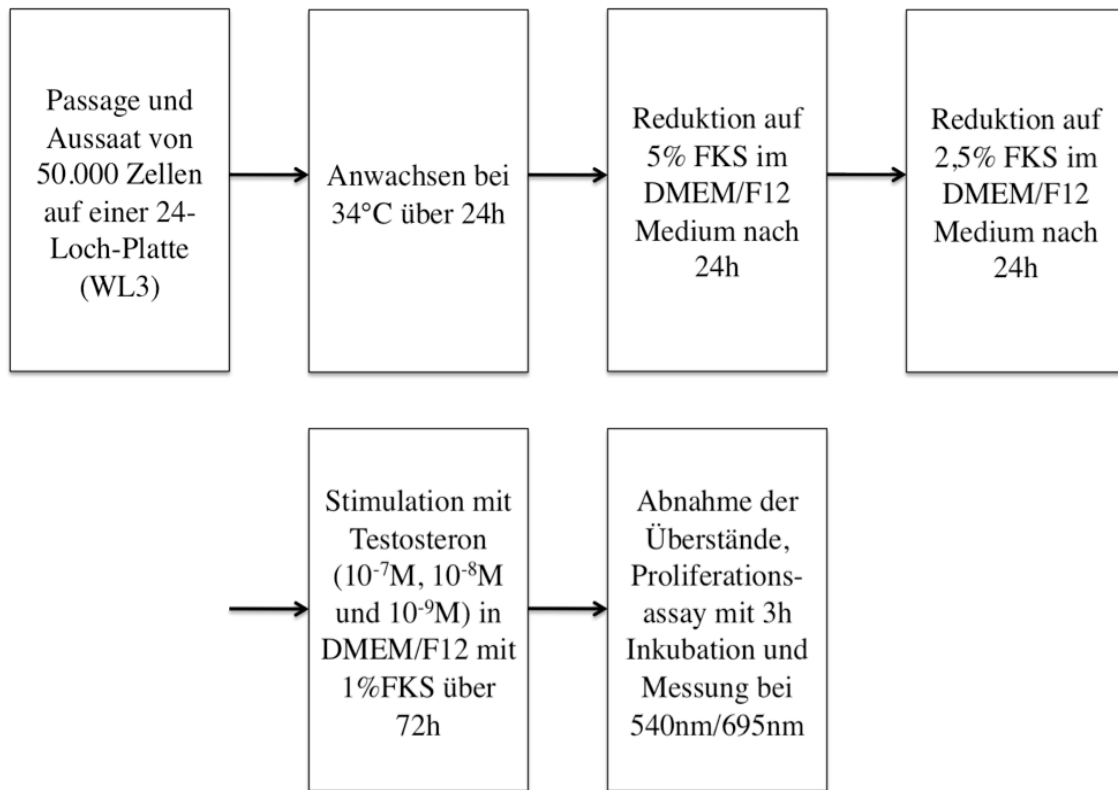


Abb.5: Modell Testosteronversuch bei WL3 Zellen

Stimulation mit Testosteron und Flutamid

Die Zellen wurden kultiviert, bis die Kulturfラスchen dicht bewachsen waren. Dann wurden die Zellen passagiert und 50.000 Zellen der jeweiligen Zellart (WL3 und SK11) in 10% FKS-Medium (WL3 in DMEM/F12 und SK11 in DMEM/HG) auf eine 24-Loch-Platte gegeben und für 24h im Brutschrank bei 34°C gelagert. Nach 24h wurden die SK11-Zellen mit Testosteron (10^{-7} M), Flutamid (10^{-6} M) und Testosteron (10^{-7} M) plus Flutamid (10^{-6} M) stimuliert. Eine Kontrolle wurde zum Vergleich belassen. Bei den SK11-Zellen wurde das FKS im Medium abrupt auf 1% FKS reduziert. Da die WL3-Zellen bei schnellem FKS-Entzug starben, wurde es stufenweise vor Beginn der Stimulation reduziert. So setzten wir 24h nach Aussaat der WL3-Zellen dem Medium 5% FKS zu, 48h nach Aussaat nur noch 2,5% FKS und 72h nach Aussaat konnte die Stimulation mit Testosteron (10^{-7} M), Flutamid (10^{-6} M) und Testosteron (10^{-7} M) plus Flutamid (10^{-6} M) in 1% FKS begonnen werden. Auch hier

wurde eine Kontrolle zum Vergleich belassen. Alle beiden Zellarten inkubierten 72h mit Testosteron und/oder Flutamid ohne Mediumwechsel im Brutschrank bei 34°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der jeweiligen Zellart und Kontrolle abgenommen und in ein Eppendorf-Hütchen pipettiert. In einer 1:7 Verdünnung wurde zusätzlich in Zellkultur-PBS gelöstes "Complete Mini" zur Inhibition von Proteasen hinzugegeben, das Hütchen geschüttelt, kurz abzentrifugiert und bei -20°C zur späteren TGF-beta-Messung mittels ELISA eingefroren.

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellen unter Testosteron und/oder Flutamid und der Vergleichsmöglichkeit der später zu bestimmenden TGF-beta Sekretion der Zellen durch Normalisierung der Zellzahl wurde anschließend ein Proliferationsassay bei beiden Zellarten durchgeführt. Nachdem die Medienüberstände aus den Wells abpipettiert wurden, wurden die Zellen mit Zellkultur-PBS gewaschen und 500µl FKS-freies Medium (WL3 in DMEM/F12 und SK11 in DMEM/HG) hinzugegeben. Dann wurde pro Vertiefung 100µl "Cell Titer" als photometrisch messbarer Farbindikator hinzugefügt und dies für 3h im Brutschrank bei 34°C inkubiert. Wichtig war dabei in jeweils einem Well ohne Zellen der 24-Well-Platten auch FKS-freies Medium mit dem Cell Titer wie beschrieben zu inkubieren, um eine Kontrolle zur Vergleichbarkeit zu haben. Nach 3h wurden 3 mal 100µl des jeweiligen, mit Farbstoff, umgesetzten Mediums der zwei unterschiedlichen Zellarten und die Kontrolle auf eine 96-Loch-Platte zur photometrischen Messung bei 540nm und einer Korrekturwellenlänge von 695 pipettiert (Abb.6 und Abb.7). Dabei wurde die Software Microplate Manager® verwendet.

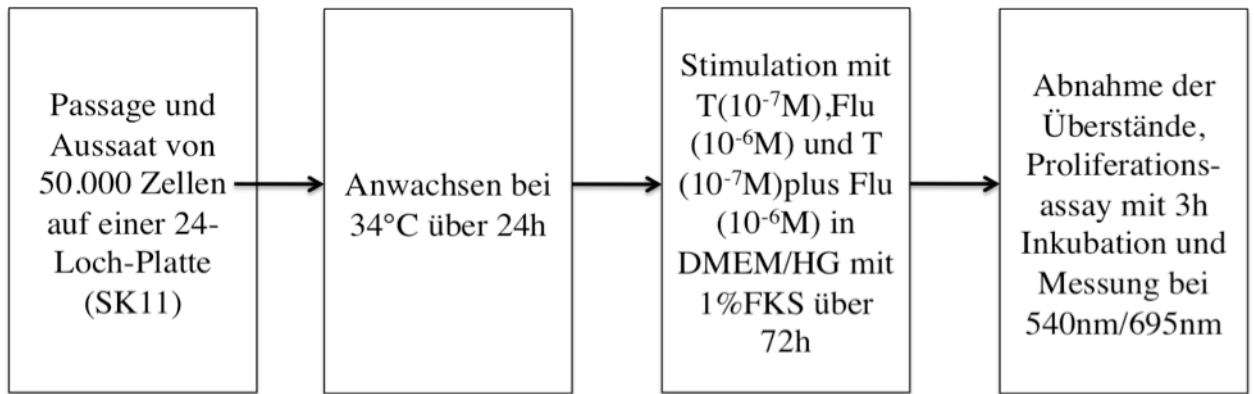


Abb.6: Modell Testosteron- und Flutamidversuch bei den SK11 Zellen

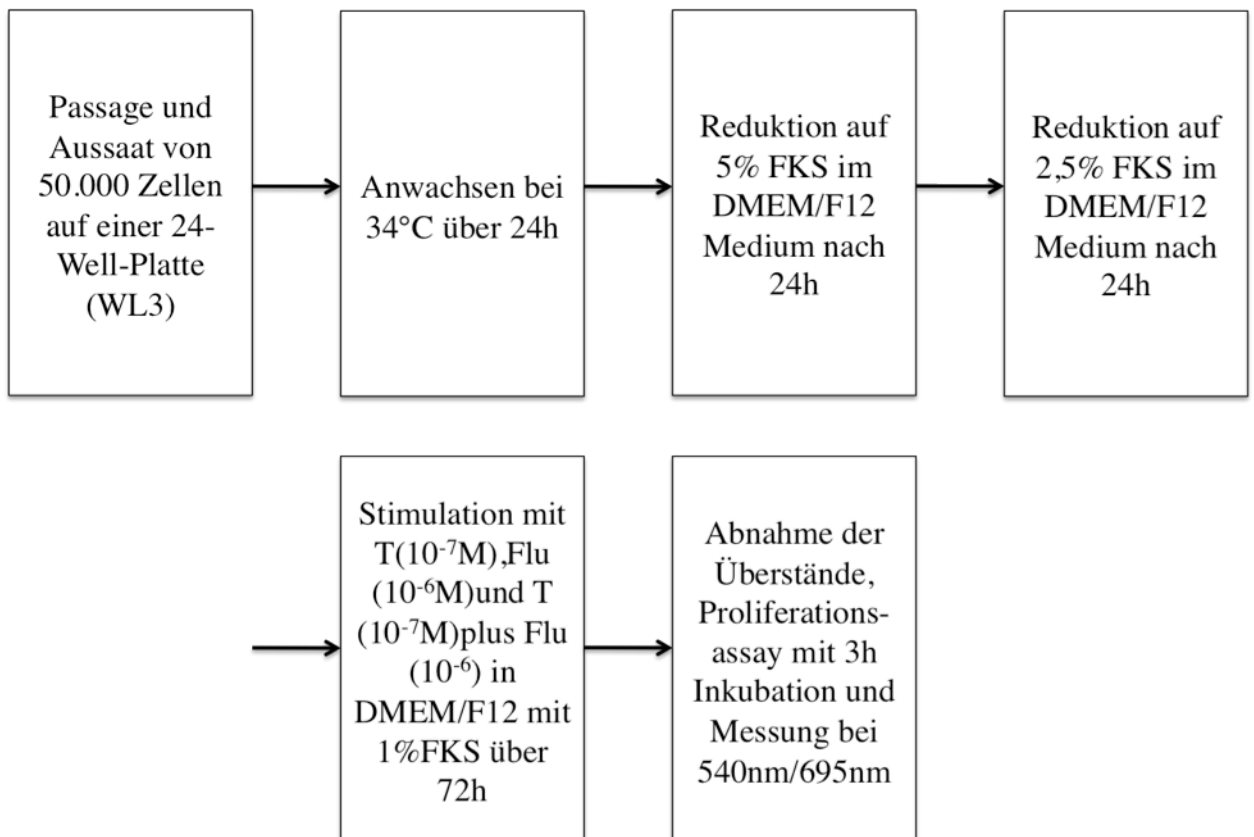


Abb.7: Modell Testosteron- und Flutamidversuch bei den WL3 Zellen

Messung der TGF β Sekretion

Die TGF- β 1- und - β 2 Sekretion nach Testosteron- und/oder Flutamidstimulation wurde mit dem human TGF- β 1- und TGF- β 2 "DuoSet ELISA Development Kit" von R&D Systems bestimmt. Die ELISA-Kits ("Solid phase enzyme-linked Immunosorbent Assay") wurden nach dem Prinzip der Sandwich-Technik entwickelt. Dabei wird ein Antikörper, der gegen die zu testende Substanz gerichtet ist, über unspezifische Wechselwirkungen an eine feste Phase (Kunststoffoberfläche) gekoppelt. Die gesamte Analytmenge in einer Probe wird an diesen spezifischen Antikörper gebunden. Ein zweiter Antikörper reagiert mit einer anderen Antigen determinante des Analyten. Im nächsten Schritt bindet der Streptavidin-Peroxidase-Enzymkomplex an den biotinylierten zweiten Antikörper (Immuno-Enzym-Sandwichkomplex). Anschließend wird die Substratmenge zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Analytkonzentration in der Probe. Die Bestandteile des TGF- β 1- und 2 ELISA-Kits sind:

- Erst-Antikörper; Maus anti-TGF- β 1 Antikörper (2 μ g/ml in Zellkultur-PBS) bzw. Maus anti-human-TGF- β 2 Antikörper (2 μ g/ml in Zellkultur-PBS); Lagerung bei -30°C
- Zweit-Antikörper; biotinylierter Huhn anti-human TGF- β 1 Antikörper (300ng/ml in Reagent Diluent) bzw. biotinylierter Ziege anti-human TGF- β 2 Standard; rekombinantes humanes TGF- β 1 (höchste Konzentration 2000pg/ml in "Reagent Diluent") bzw. rekombinantes humanes TGF- β 2 (höchste Konzentration 2000pg/ml in "Reagent Diluent"; Lagerung bei -70°C
- Streptavidin-HRP; gebrauchsfertig, (1:200 mit "Reagent Diluent" verdünnt); Lagerung bei 4°C

Erforderliche Reagenzien, die nicht im Kit enthalten sind:

- 1M HCl
- 1M NaOH
- Zellkultur-PBS
- Wasch-Puffer; 0,05% Tween 20 in Zellkultur-PBS
- Block-Puffer; 5% Tween 20 in Zellkultur-PBS
- Reagent Diluent; 1% BSA in Zellkultur-PBS
- Substratlösung; "Color" Reagenz A und B (R&D Systems # DY999)
- Stopp Lösung; 1M Schwefelsäure (H_2SO_4)

Arbeitsgang

Die 96-Loch-Mikrotiter-Platte wurde mit 100µl des Erst-Antikörpers beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Abdeckfolie zum Schutz vor Kondensation wurde auf die Platte geklebt. Anschließend wurde die Antikörperlösung abpipettiert und jede Vertiefung 3 mal mit 400µl Wasch-Puffer gewaschen. Dann wurden 300µl "Reagent Diluent" pro Vertiefung aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. In dieser Zeit wurden die Proben mit 1M HCl aktiviert und nach 15min Einwirkzeit mit 1M NaOH neutralisiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 96-Loch-Mikrotiter-Platte nochmals dreimal gewaschen, die Standardverdünnungen (7-Punkt-Standard: 2ng/ml, 1ng/ml, 0,5ng/ml, 0,25ng/ml, 0,125ng/ml, 0,0625ng/ml, Leerwert="Reagent Diluent") und die unverdünnten Proben in doppelter Ausführung zur Mittelwertbestimmung aufgetragen (100µl pro Vertiefung) und für 2 Stunden bei

Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Analyte wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und 100µl des Zweit-Antikörpers pro Vertiefung aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Ausbildung des Sandwich-Komplexes). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Platte entfernt. Danach wurden 100µl des Streptavidin-HRP-Konjugates pro Vertiefung pipettiert und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen fügten wir jeder Vertiefung 100µl der Substratlösung zu und inkubierten lichtgeschützt für weitere 20min bei Raumtemperatur. Damit wurde die Enzymreaktion gestartet (Immuno-Enzym-Sandwichkomplex), die nach Ablauf der Zeit mit 50µl Stopp Lösung unterbrochen wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes in den Vertiefungen zu gewährleisten, wurde die Mikrotiterplatter vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Korrekturwellenlänge von 540nm die Absorption gemessen. Dabei wurde die Software Microplate Manager® verwendet. Die aktuellen Konzentrationen wurden mit Hilfe der Steigungsgeraden der Standardreihe berechnet.

Histologische Methoden

Herstellung der Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Biopsien wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leitz, Wetzlar) in 5µm dünne Scheiben geschnitten. Dann wurden sie in 40°C warmes Wasser überführt und auf sialinisierte Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel-Gläser) aufgetragen. Anschließend wurden sie zur Trockung und Anheftung auf dem Objektträger über Nacht im Trockenschrank bei 37°C aufbewahrt. Vor der jeweiligen Färbung erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol und anschließender Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (siehe Arbeitsgang Immunhistochemie).

Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Um die Morphologie des Hodengewebes beurteilen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Dazu wurde Mayers Hämalaunlösung (Merck) und Eosin G (Merck) verwendet. Mayers Hämalaunfärbung war gebrauchsfertig. Das Eosin wurde als 1%ige wässrige Lösung verwendet und mit einem Tropfen Eisessig angesäuert (siehe Arbeitsgang Immunhistochemie).

Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in drei Schritten mit dem EnVision™ Detektionssystem (DAKO) durchgeführt.

1. Der Primärantikörper (Tab. 1) bindet das Epitop, gegen das er gerichtet ist.
2. Der Sekundärantikörper (Tab. 2) bindet an den speziesspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers. Beim EnVision-System (DAKO) ist am Fc-Teil des Sekundärantikörpers ein Dextranpolymer gebunden. Es trägt eine Vielzahl an Meerrettich-Peroxidasen, wodurch das Signal verstärkt wird. Die Hintergrundfärbung wird dadurch herabgesetzt und der Primärantikörper kann in geringeren Konzentrationen benutzt werden.
3. Als Chromogen verwendeten wir 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB). Es wird von der Peroxidase zu einem braunen unlöslichen Farbstoff oxidiert. Dieser markiert indirekt das vom Primärantikörper erkannte Antigen.

Für die Primärantikörper (Tab. 1) wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen durch Verdünnungsreihen auf überschüssigen Schnitten von Hodengewebe adulter Männer ermittelt. Die Verdünnung des Erstantikörpers erfolgte in Antibody Diluent (DAKO).

Tab. 1: Primärantikörper

Primärer Antikörper	Art	Verdünnung	Produzent	gerichtet gegen	Firma
Anti-Androgenrezeptor Cruz (N-20):SC-816	polyklonal	1:2000	Kaninchen	Mensch	Santa
Anti-TGF- β 2 Cruz (V):SC 90	polyklonal	1:300	Kaninchen	Mensch	Santa

Tab. 2: Sekundärantikörper

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-rabbit envision labelled polymer	gebrauchsfertig	DAKO

Arbeitsgang Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden vor der Färbung 3x5 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe (2x5 min 100% Ethanol, jeweils 10 min 96%, 80% und 70% Ethanol) und Waschung in A.dest (5 min) und PBS 1:10 (5 min) rehydriert. Um die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes zu blockieren, wurden die Schnitte 20 min in 1xPBS 1:10 und 3% H₂O₂ (Merck) inkubiert und dann 3x5 min in 1xPBS 1:10 gewaschen. Die Antikörperdemaskierung erfolgte durch Hitzeanwendung. Die Schnitte wurden bei 94°C in einem Kocher (Dampfgarer Multigourmet, Braun) in "Target Retrieval Solution" (1:10, pH 6,1; DAKO) für 30 min erhitzt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Schnitte einmal in 1xPBS 1:10 geschwenkt und 3x5 min in 1xPBS 1:10 gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Schnitte dann 20 min in 2% Magermilchpulver (Fluka) mit 1xPBS 1:10 inkubiert. Danach wurde die Magermilch abgeklopft und vom Objektträger gewischt. Daraufhin wurden die

Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tab. 1) in einer Feuchtkammer für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung auf Zellstoff abgeklopft und die Schnitte 3x5 min in 1xPBS 1:10 gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Nun wurden die Schnitte 30 min mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 2) inkubiert und ebenfalls durch 3x5 min Waschen in 1xPBS 1:10 entfernt. Die Substratlösung (1:50 Verdünnung DAB-Substrat in "DAB-Diluent") wurde auf die Schnitte gegeben und 5-10 min im Dunkeln belassen. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion mit A.dest gestoppt und die Schnitte nochmals 1x5 min in 1xPBS 1:10 gewaschen. Nun konnte die Gegenfärbung erfolgen. Die Schnitte wurden 2 min in Hämalun (1:5 verdünnt) gestellt, 3 min in Leitungswasser gebläut und noch einmal durch A.dest gezogen. Zum Schluss wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (kurz durch 70% und 96% Ethanol durchgezogen und 2x10 min in 100% Ethanol) und nach 2x10 min Inkubation in Xylol mit Entellan® (Merck) eingedeckelt.

Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung wurde nur mit Daten, die mindestens dreimal und mehr im Duplikat vorlagen, durchgeführt. Hierfür wurde das Statistikprogramm InStat 3 Graphpad® (www.graphpad.com) und Microsoft Excel verwendet. Es wurden der Kruskal Wallis- und der Mann-Whitney-Test verwendet.

ERGEBNISSE

SEKRETION DER TGF-BETAS VON TESTIKULÄREN ZELLEN

In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass in der Pubertät die Expression von TGF- β 2 im Hoden bei einem Anstieg von FSH sinkt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es durch Androgenentzug zur Apoptose in der Prostata kommt. Dies ist vermutlich durch einen gleichzeitigen Anstieg der TGF-betas bedingt. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass Testosteron eine inhibierende Wirkung auf die Sekretion der TGF-betas haben könnte. Dies versuchten wir mit unseren Untersuchungen an testikulären Zellen in Kultur zu beweisen.

Untersuchung der TGF- β 1, - β 2 und - β 3 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

Zur Untersuchung der Testosteron-induzierten Veränderung der TGF- β 1, - β 2 und - β 3 Sekretion in Zellkultur wurden die WL3 Zellen, bei denen es sich vor allem um Sertolizellen und vereinzelt Peritubulär- und Mesenchymalzellen handelt, für 72 h mit Testosteron in unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-9} M bis 10^{-7} M) inkubiert. Im Anschluss wurde die TGF- β 1 und TGF- β 2 Sekretion mittels ELISA photometrisch gemessen. Die Werte wurden auf eine Million Zellen pro Ansatz standardisiert, um die Wirkung von Testosteron auf die Proliferation auszugleichen (siehe Material und Methoden).

Proliferation der WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

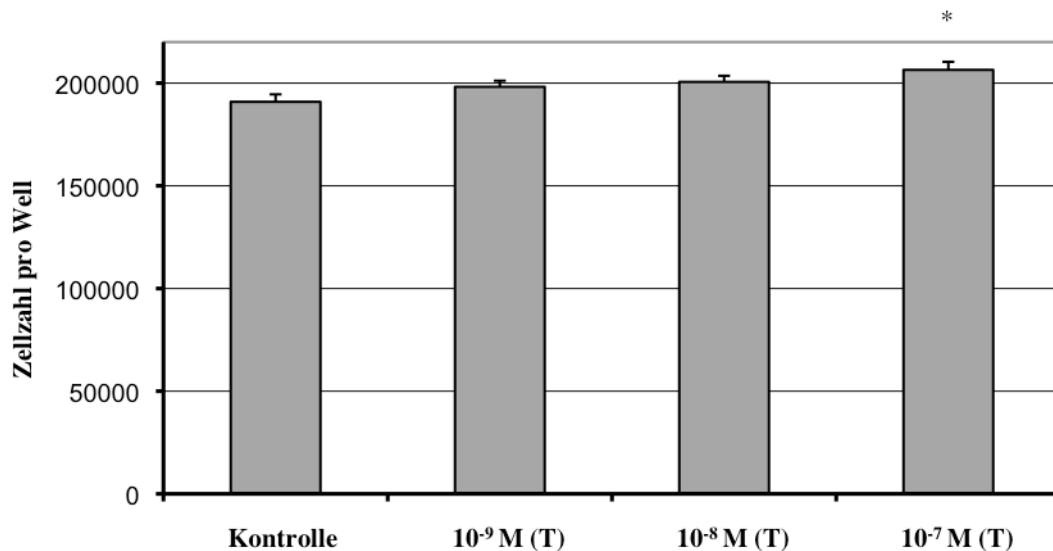


Abb 8: Zellproliferation der Sertoli-Mischzellen (WL3) nach Stimulation mit Testosteron. Die Proliferationsrate stieg nach Stimulation mit Testosteron signifikant und dosisabhängig an. Darstellung des MW \pm SEM ($n = 5$). Mit dem Kruskal Wallis Test ergaben sich folgende Signifikanzen: Kontrolle vs T 10⁻⁷ M * $p < 0,01$.

Nach 72-stündigem Wachstum der unstimulierten WL3 Zellen vermehrten sich diese um das 3,8-fache. Diese Zellproliferation wurde durch die Stimulation mit Testosteron signifikant verstärkt. Abhängig von der Testosteronkonzentration nahm die Zellproliferation kontinuierlich zu und stieg bei einer Testosteronkonzentration von (10⁻⁷ M) signifikant auf das 1,1-fache im Vergleich zur Kontrolle an (Abb. 8).

TGF- β 1 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

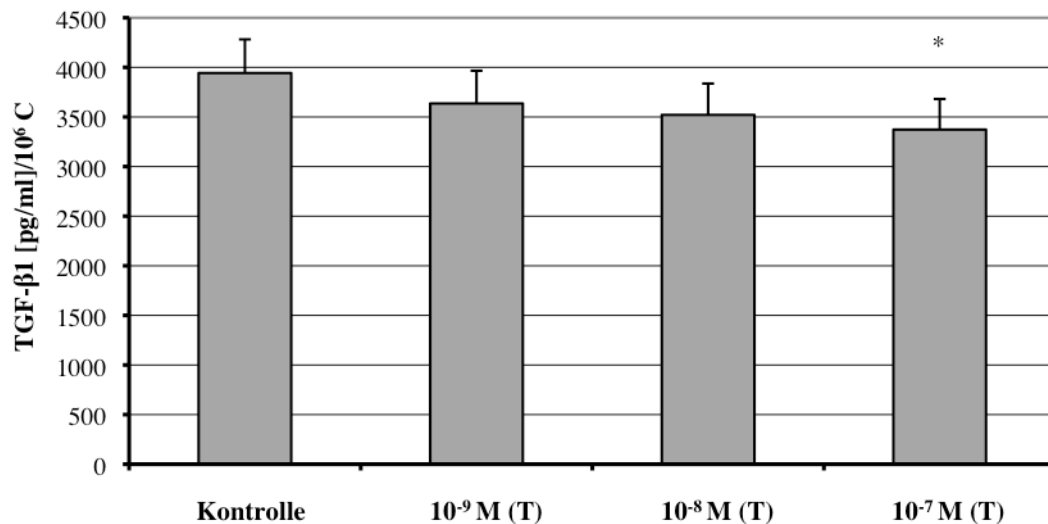


Abb.9: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 1 im Medium der Sertoli-Mischzellen (WL3) nach Stimulation mit Testosteron. Die Behandlung mit Testosteron (10^{-7} M) reduzierte die Sekretionsrate von TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant und dosisabhängig. Darstellung des MW \pm SEM (n = 5). Mit dem Kruskal Wallis Test ergaben sich folgende Signifikanzen: Kontrolle vs T 10^{-7} M *p < 0,05. C = Cells (Zellen)

Die unbehandelten Sertoli-Mischzellen (WL3) sezernierten durchschnittlich 4000 pg/ml TGF- β 1. Mit Anstieg der Testosteronkonzentration nahm die TGF- β 1 Sekretion dosisabhängig ab. Im Vergleich zur Kontrolle kam es bei einer Testosteronstimulation von (10^{-7} M) zu einer signifikanten Reduktion der TGF- β 1 Sekretion auf das 0,85-fache (Abb. 9).

TGF- β 2 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

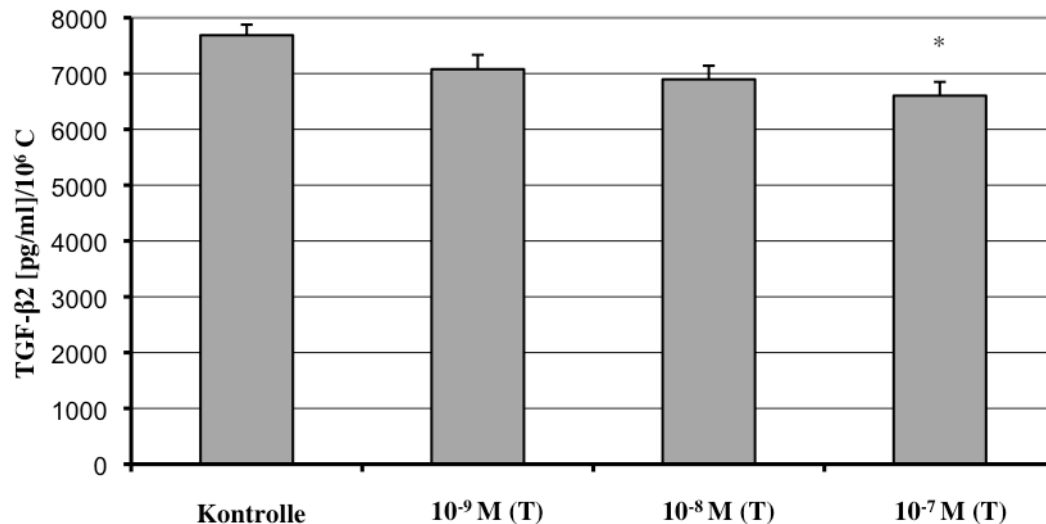


Abb.10: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 2 im Medium der Sertoli-Mischzellen (WL3) nach Stimulation mit Testosteron. Die Behandlung mit Testosteron (10^{-7} M) reduzierte die Sekretionsrate von TGF- β 2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant und dosisabhängig. Darstellung des MW \pm SEM (n = 5). Mit dem Kruskal Wallis Test ergab sich die folgende Signifikanz: Kontrolle vs T 10^{-7} M *p < 0,05. Cells = Cells (Zellen)

Die Sertoli-Mischzellen (WL3) sezernierten durchschnittlich 7700 pg/ml TGF- β 2. Durch Stimulation mit Testosteron reduzierte sich die Sekretionsrate des Wachstumsfaktors TGF- β 2 abhängig von der Konzentration des Androgens. Im Vergleich zur Kontrolle verringerte sich TGF- β 2 bei einer Stimulation von (10^{-7} M) signifikant auf das 0,86-fache (Abb. 10).

TGF- β 3 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

Die WL3 Zellen sezernierten kein TGF- β 3.

Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2 Sekretion von SK11 Zellen unter dem Einfluss von Testosteron

Zur Untersuchung der Testosteron-induzierten Veränderung der TGF- β 1 und - β 2 Sekretion in Zellkultur wurden die SK11 Zellen, bei denen es sich um eine Kultur aus ausschließlich Sertolizellen handelt, für 72 h mit Testosteron in unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-9} M bis 10^{-7} M) inkubiert. Im Anschluss wurde die TGF- β Sekretion mittels ELISA photometrisch gemessen. Die Werte wurden auf eine Million Zellen pro Ansatz standardisiert, um die Wirkung von Testosteron auf die Proliferation auszugleichen (siehe Material und Methoden).

Proliferation von SK11 Zellen unter Stimulation von Testosteron

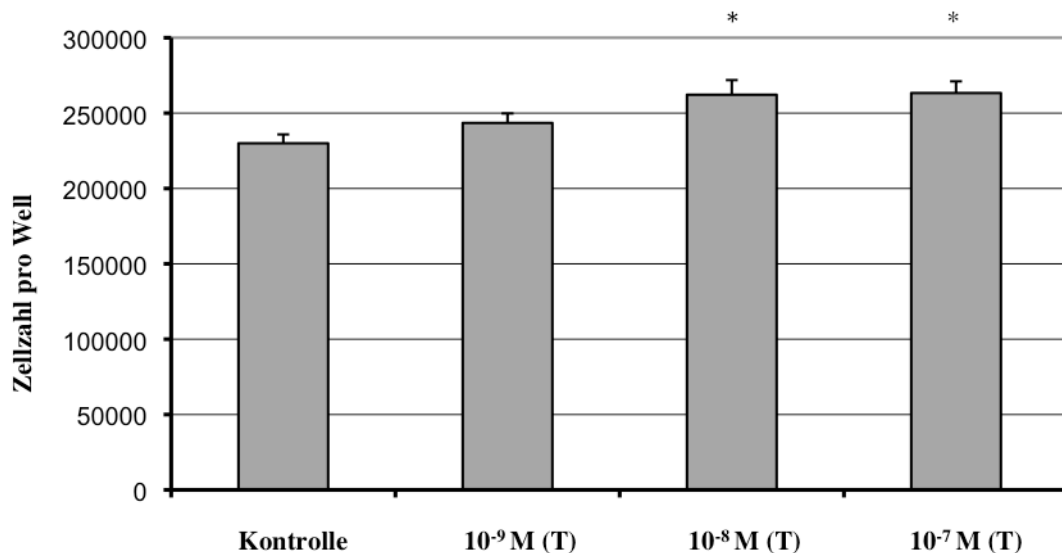


Abb.11: Zellproliferation der Sertolizellen (SK11) nach Stimulation mit Testosteron. Die Proliferationsrate steigt nach Stimulation mit Testosteron signifikant und dosisabhängig an. Darstellung des MW \pm SEM (n = 7). Mit dem Kruskal Wallis Test ergab sich die folgende Signifikanz: Kontrolle vs T 10^{-8} M *p < 0,01 und Kontrolle vs T 10^{-7} M *p < 0,01.

Das Wachstum der SK11 Zellen nahm mit Anstieg der Testosteronkonzentration stetig zu. In der Kontrolle vermehrten sich die Zellen durch Zellteilung innerhalb von drei Tagen um das 4,6-fache im Vergleich zur Aussaat. Die Zellen, die mit einer Testosteronkonzentration von (10^{-8} M) stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Proliferation um das 1,14-fache. Die Zellen, die mit Testosteron (10^{-7} M) stimuliert wurden, proliferierten signifikant stärker um das 1,145-fache (Abb.11).

TGF- β 1 Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

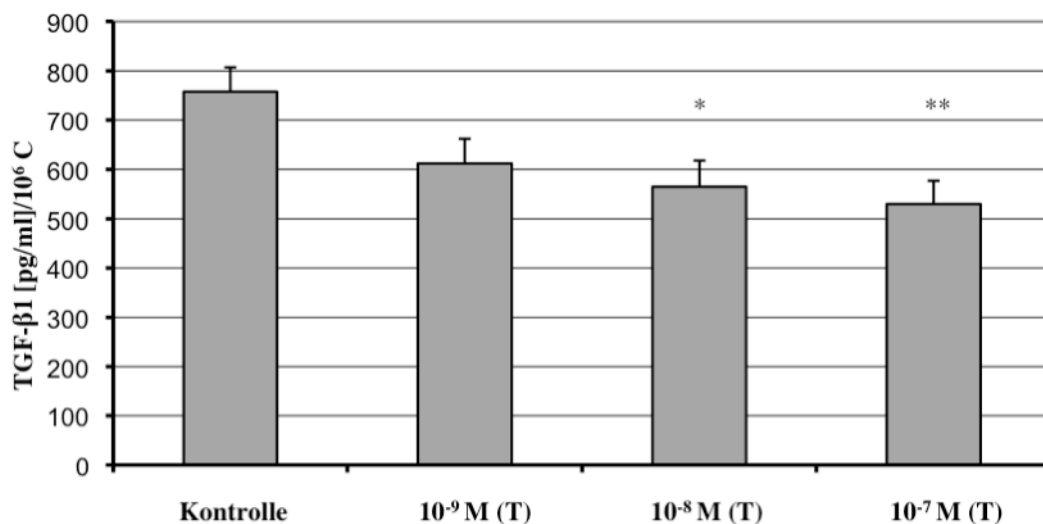


Abb.12: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 1 im Medium der SK11 Sertolizellen nach Stimulation mit Testosteron. Die Behandlung mit Testosteron reduzierte die Sekretionsrate von TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant und dosisabhängig. Darstellung des MW \pm SEM (n = 7). Mit dem Kruskal Wallis Test ergaben sich folgende Signifikanzen: Kontrolle vs T 10^{-8} M *p < 0,05 und Kontrolle vs T 10^{-7} M **p < 0,01. C = Cells (Zellen)

Die SK11 Zellen produzierten wesentlich weniger TGF- β 1 als die WL3 Zellen. Statt 4000 pg/ml TGF- β 1 wie bei der Kontrolle der WL3 Zellen sezernierten die unbehandelten SK11 Zellen nur durchschnittlich 760 pg/ml TGF- β 1. Wiederum sezernierten die SK11 Zellen dreimal soviel TGF- β 1 wie TGF- β 2 (Vergleich Abb. 12 und 13). Mit ansteigender Zufuhr von Testosteron im Medium sank die Sekretion von TGF- β 1 in den SK11 Zellen dosisabhängig. Bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-8} M und 10^{-7} M nahm die TGF- β 1 Sekretion der SK11 Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Am stärksten jedoch bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-7} M, auf das 0,7-fache (Abb. 12).

TGF- β 2 Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

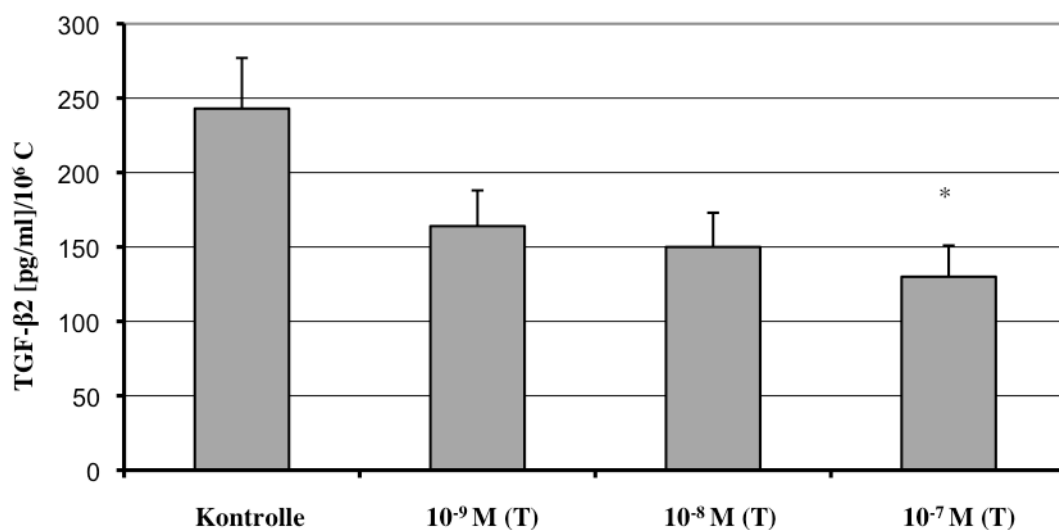


Abb.13: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 2 im Medium von SK11 Zellen nach Stimulation mit Testosteron. Die Behandlung mit Testosteron (10^{-7} M) reduzierte die Sekretionsrate von TGF- β 2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant und dosisabhängig. Darstellung des MW \pm SEM (n = 6). Mit dem Kruskal Wallis Test ergab sich die folgende Signifikanz: Kontrolle vs T 10^{-7} M *p < 0,05. C = Cells (Zellen)

Die SK11 Zellen produzierten mit durchschnittlich 240 pg/ml sehr wenig TGF- β 2. Trotzdem konnte man eine signifikante testosteronabhängige Reduktion zwischen der Kontrolle und den Zellen, die mit Testosteron (10^{-7} M) behandelt wurden, nachweisen. Außerdem konnte auch hier der Trend der dosisabhängigen Reduktion von TGF- β durch Testosteron beobachtet werden (Abb.13).

Proliferation von GC2 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

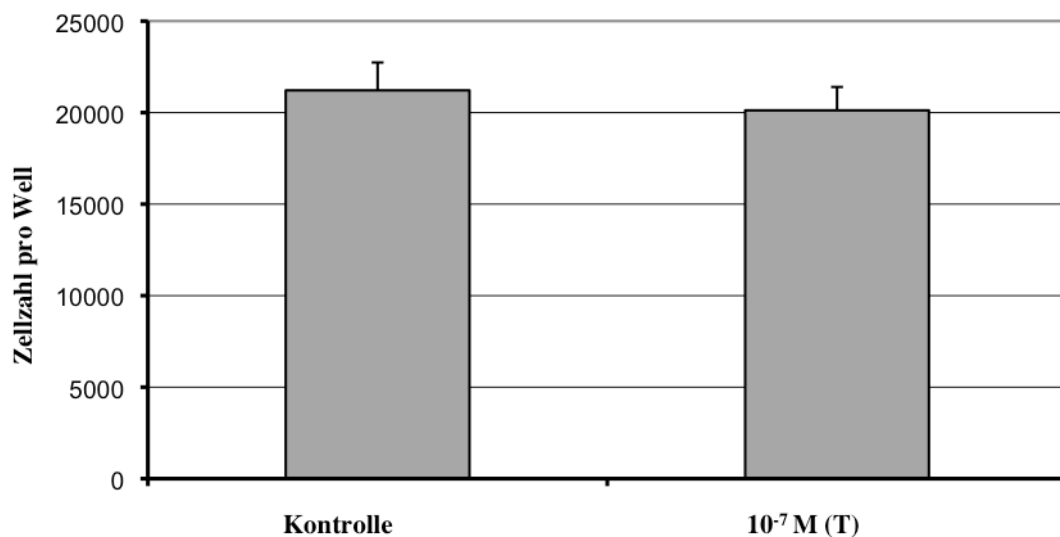


Abb.14: Zellproliferation der Keimzelllinie GC2 nach Stimulation mit Testosteron. Die Proliferationsrate scheint nach Stimulation mit Testosteron gering abzunehmen. Darstellung des MW \pm SEM (n = 3). Mit dem Mann Whitney-Test ergab sich keine Signifikanz.

Bei den GC2 Zellen, die Keimzellen sind, hat Testosteron keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation (Abb. 14).

TGF- β 1 Sekretion von GC2 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

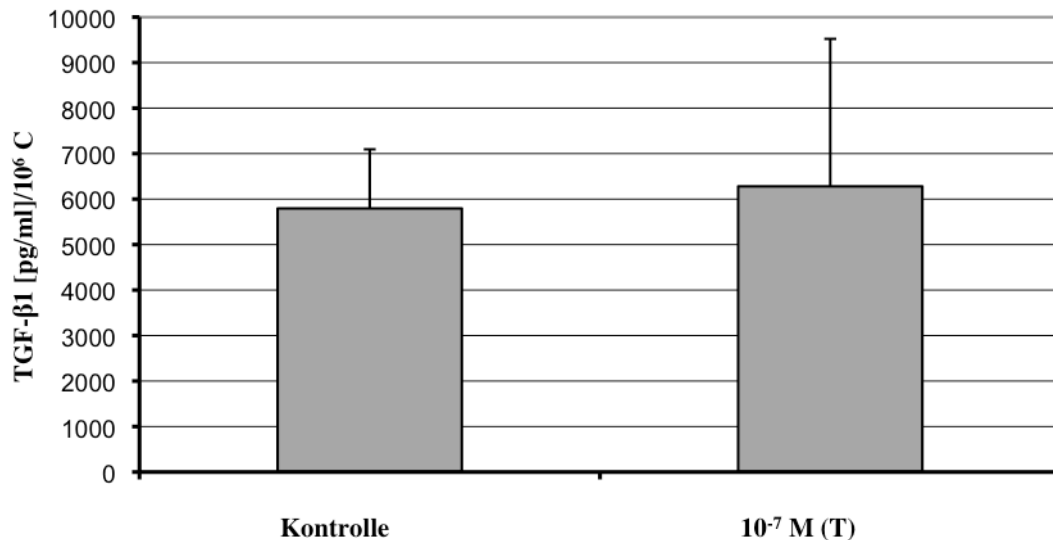


Abb.15: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 1 im Medium der Keimzelllinie GC2 nach Stimulation mit Testosteron. Die Behandlung mit Testosteron (10^{-7} M) zeigte nur eine geringe Erhöhung der TGF- β 1 Sekretionsrate. Darstellung des MW \pm SEM (n = 3). Mit dem Mann-Whitney Test ergab sich keine Signifikanz.

Die GC2 Zellen sezernierten unbehandelt durchschnittlich 5800 pg/ml TGF- β 1. Es ließ sich keine Veränderung ihrer TGF- β 1 Sekretion durch Testosteron feststellen. Der geringe Anstieg der Sekretion nach Stimulation mit Testosteron (10^{-7} M) im Vergleich zur Kontrolle ist nicht signifikant (Abb. 15).

TGF- β 2- und- β 3 Sekretion von GC2 Zellen unter Stimulation mit Testosteron

Die GC2 Zellen, eine Kultur aus Keimzellen, sezernierten weder TGF- β 2 noch TGF- β 3. Daraufhin haben wir uns gegen weitere Versuche mit den GC2 Zellen entschieden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der TGF- β 1,- β 2 und- β 3 Sekretion testikulärer Zellen unter Testosteronstimulation

Die WL3 Zellen (Mischkultur mit Sertolizellen) als auch die SK11 Zellen (reine Sertolizellen) reagierten auf die Testosteronstimulation signifikant mit einer Zunahme der Proliferation, nur die GC2 Zellen (Keimzellen) reagierten nicht auf die Testosteronzugabe.

Am stärksten sezernierten die Keimzellen (GC2) TGF- β 1 gefolgt von den Sertoli-Mischzellen (WL3). Die reinen Sertolizellen (SK11) sezernierten mit 1/5 der Sekretion der Sertoli-Mischkultur (WL3) am wenigsten TGF- β 1. Bei den reinen Sertolizellen (SK11) als auch der Sertoli-Mischzellkultur (WL3) wurde die TGF- β 1 Sekretion signifikant und dosisabhängig durch Testosteron supprimiert. Nur die Keimzellkultur (GC2) ließ sich nicht durch Testosteron beeinflussen.

TGF- β 2 wurde am höchsten von der Sertoli-Mischkultur (WL3) sezerniert. Im Vergleich sezernierten die reinen Sertolizellen (SK11) nur 1/36 an TGF- β 2. Die Keimzellen (GC2) sezernierten kein TGF- β 2. Insgesamt ließ sich eine testosteronabhängige Reduktion der TGF- β 2 Sekretion bei der Sertoli-Mischzellkultur (WL3) als auch den reinen Sertolizellen (SK11) aufzeigen. Dies war bei beiden Zellkulturen signifikant und dosisabhängig.

TGF- β 3 wurde weder von der Mischkultur aus Sertolizellen (WL3) gebildet, noch von der Kultur mit ausschließlich Keimzellen (GC2). Aus diesem Grund entschieden wir uns gegen weitere Messungen von TGF- β 3.

INHIBITION DER TESTOSTERONWIRKUNG DURCH FLUTAMID

Flutamid ist ein Antiandrogen, das den Androgen-Rezeptor blockiert (Peets et al. 1974). Ausserdem wurde berichtet, dass Flutamid einen Einfluss auf den apoptotischen Signalweg haben könnte, unabhängig von seiner antiandrogenen Wirkung (Zhang et al. 2005). Wir testeten, ob Flutamid die vorher gezeigte Wirkung von Testosteron auf TGF- β 1 und - β 2 in den testikulären Zellkulturen aufgrund seiner antiandrogenen Wirkung aufhebt.

Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

Im Versuch inkubierten wir die WL3 Zellen über 72 Stunden getrennt mit Testosteron (10^{-7} M), und mit Flutamid (10^{-6} M) als auch mit einer Kombination von Testosteron (10^{-7} M) und Flutamid (10^{-6} M). Anschließend wurde TGF- β 1 und TGF- β 2 im Zellmedium mittels ELISA photometrisch bestimmt. Danach wurden die Werte auf eine Million Zellen pro Ansatz standardisiert, um die Wirkung von Testosteron und Flutamid auf die Proliferation auszugleichen (siehe Material und Methoden).

Proliferation von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

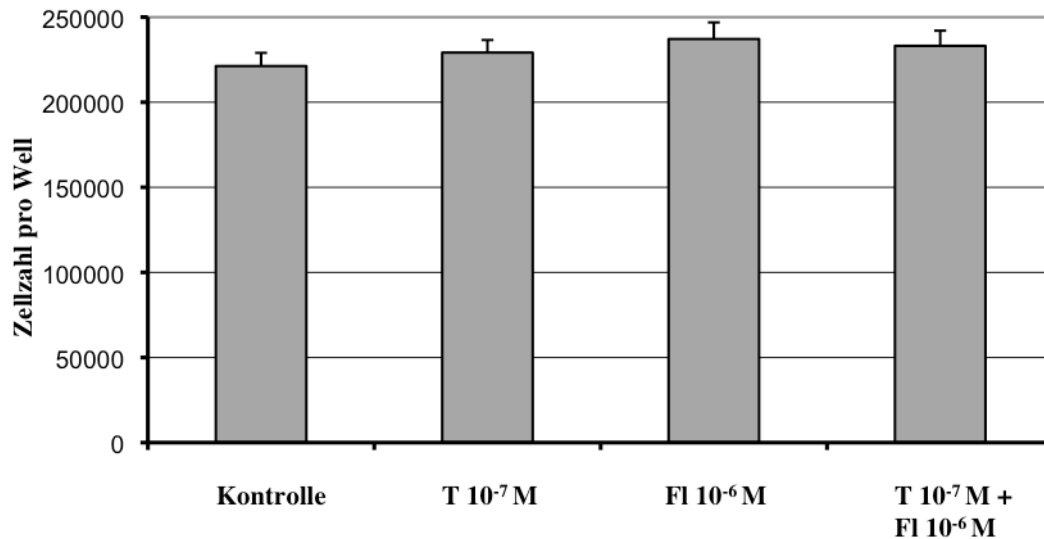


Abb.16: Zellproliferation der Sertolimischzellen (WL3) nach Stimulation mit Testosteron (T, 10^{-7} M), Flutamid (Fl, 10^{-6} M) und Testosteron (T, 10^{-7} M) plus Flutamid (Fl, 10^{-6} M). Es zeigte sich kein Unterschied in der Proliferation unter Testosteron und der Proliferation unter Testosteron und Flutamid. Darstellung des $MW \pm SEM$ ($n = 6$). Mit dem Mann Whitney Test ergab sich keine Signifikanz.

Bei den WL3 Zellen schien die Proliferation unter Testosteron als auch unter Flutamid gering anzusteigen. Wurden die Zellen mit Testosteron und Flutamid zusammen stimuliert, nahm die Zellproliferation im Vergleich zur Stimulation mit Flutamid alleine ab. Ein Unterschied zwischen der Stimulation mit alleinigem Testosteron und Testosteron mit Flutamid ließ sich nicht erkennen und auch nicht statistisch belegen (Abb. 16).

TGF- β 1 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

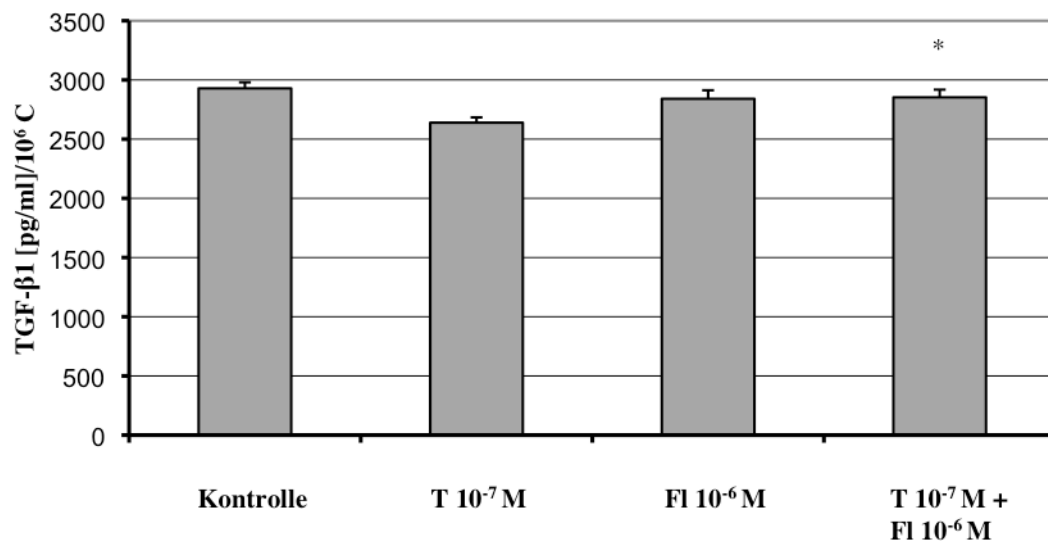


Abb.17: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 1 im Medium der Sertolimischnzellen (WL3) nach Stimulation mit Testosteron (T) und Testosteron plus Flutamid (Fl). Die Behandlung mit Flutamid (10^{-6} M) erhöhte die zuvor durch Testosteron (10^{-7} M) reduzierte Sekretionsrate signifikant. Darstellung des MW \pm SEM (n = 6). Mit dem Mann Whitney Test ergaben sich folgende Signifikanzen: T 10^{-7} M vs T 10^{-7} M + Fl 10^{-6} M, *p = 0,0205.

Testosteron bewirkte in den WL3 Zellen, wie schon oben beschrieben, eine Suppression der Sekretion von TGF- β 1. Diese wurde durch Flutamid (10^{-6} M) aufgehoben. Die unbehandelten Zellen produzierten durchschnittlich 3000 pg/ml. Die TGF- β 1-Sekretion wurde durch Testosteron auf das 0,9-fache reduziert. Nach Zusatz von Flutamid erhöhte sich die zuvor reduzierte Sekretionsrate signifikant auf das 1,08-fache und damit näherte sich die Sekretionsrate von TGF- β 1 erneut der Sekretionsrate der unbehandelten Zellen an (Abb. 17).

TGF- β 2 Sekretion von WL3 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

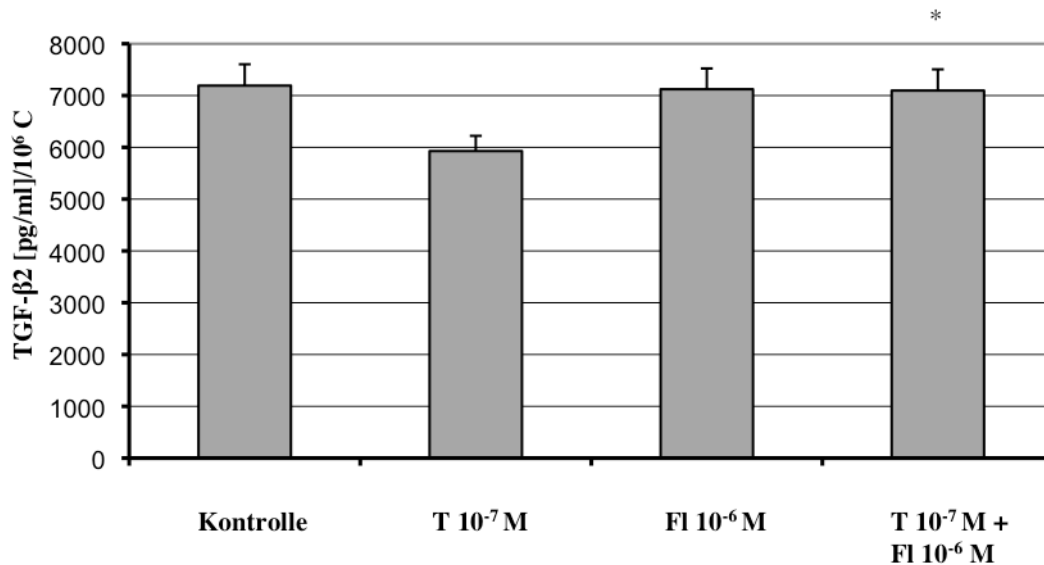


Abb.18: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 2 im Medium der Sertolimischzellen nach Stimulation mit Testosteron (T, 10⁻⁷ M) und Testosteron (T, 10⁻⁷ M) plus Flutamid (Fl, 10⁻⁶ M). Die Behandlung mit Flutamid (Fl, 10⁻⁶ M) erhöhte die zuvor durch Testosteron (T, 10⁻⁷ M) reduzierte Sekretionsrate signifikant. Darstellung des MW \pm SEM (n = 7). Mit dem Mann Whitney Test ergaben sich folgende Signifikanzen: T 10⁻⁷ M vs T 10⁻⁷ M + Fl 10⁻⁶ M *p = 0,0162. C = Cells (Zellen)

Die zuvor suppressierte TGF- β 2 Sekretion durch Testosteron (10⁻⁷ M) wurde durch die zusätzliche Gabe von Flutamid (10⁻⁶ M) signifikant angehoben. Die durchschnittliche Sekretion unbehandelter WL3-Zellen betrug 7200 pg/ml TGF- β 2 und wurde durch Testosteron erneut auf das 0,85-fache reduziert, während sie nach Zugabe von Flutamid im Vergleich erneut auf das 1,2-fache anstieg und somit wieder auf Höhe der Kontrolle lag (Abb. 18).

Untersuchung der TGF- β 1 und - β 2- Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

Im Versuch inkubierten wir die SK11 Zellen über 72 Stunden getrennt mit Testosteron (10^{-7} M), Flutamid (10^{-6} M) als auch mit einer Kombination von Testosteron (10^{-7} M) und Flutamid (10^{-6} M). Anschließend wurden TGF- β 1 und TGF- β 2 im Zellmedium mittels ELISA photometrisch bestimmt. Danach wurden die Werte auf eine Million Zellen pro Ansatz standardisiert, um die Wirkung von Testosteron und Flutamid auf die Proliferation auszugleichen (siehe Material und Methoden).

Proliferation von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

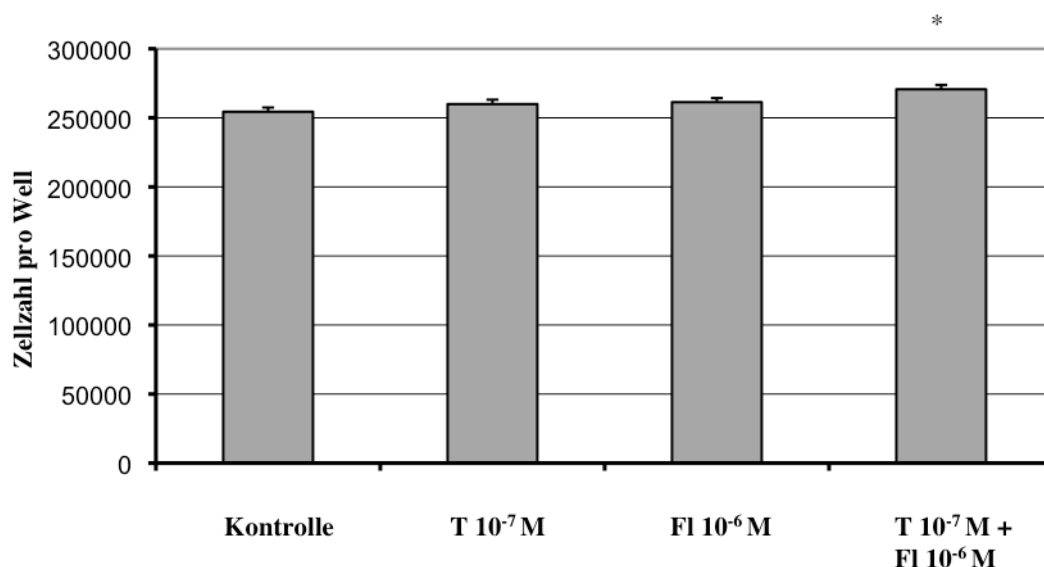


Abb.19: Zellproliferation der reinen Sertolizellen (SK11) nach Stimulation mit Testosteron (T, 10^{-7} M), Flutamid (Fl, 10^{-6} M) und Testosteron (T, 10^{-7} M) plus Flutamid (Fl, 10^{-6} M). Die Proliferation nahm unter Testosteron aber auch Flutamid zu. Die Proliferation erreichte eine Signifikanz bei der Stimulation mit Testosteron plus Flutamid. Darstellung des MW \pm SEM (n = 8). Mit dem Mann Whitney Test ergab sich folgende Signifikanz: T 10^{-7} M vs T 10^{-7} M + Fl 10^{-6} M *p = < 0,01.

Bei den SK11 Zellen zeichnete sich der Trend ab, dass die Zellproliferation unter Flutamid im Vergleich zur Stimulation mit Testosteron weiter zunahm. Des Weiteren war bei der Kultur aus reinen Sertolizellen die Zellvermehrung unter Testosteron plus Flutamid am höchsten. Dieser Anstieg war zwar im Vergleich zur Stimulation mit Testosteron signifikant war aber auch so gering, dass es sich um einen Zufall handeln könnte.

TGF- β 1 Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

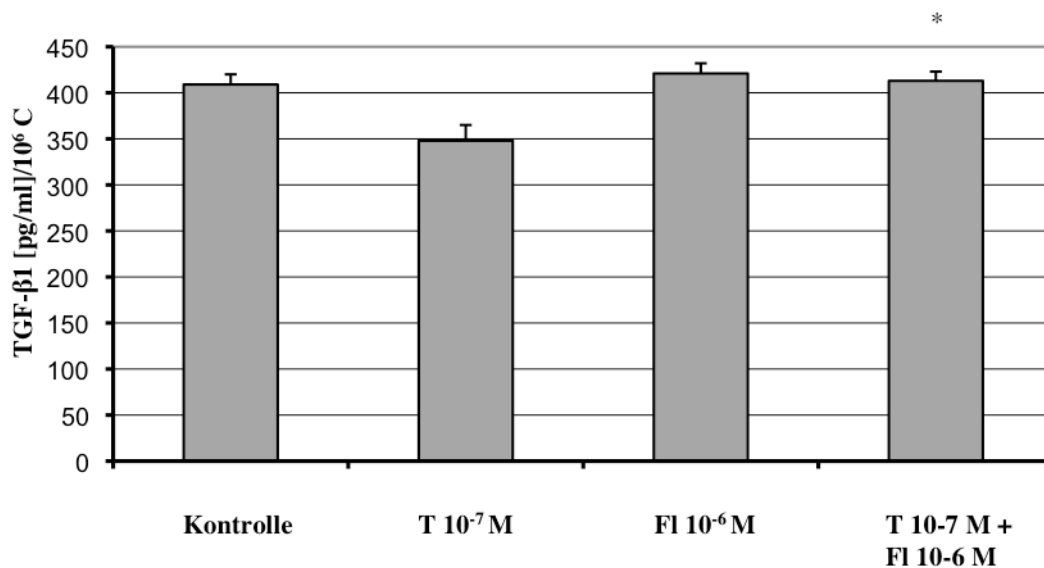


Abb.20: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 1 im Medium der Sertolizellen nach Stimulation mit Testosteron (T, 10⁻⁷ M), Flutamid (Fl, 10⁻⁶ M) und Testosteron (T, 10⁻⁷ M) plus Flutamid (Fl, 10⁻⁶ M). Die Behandlung mit Testosteron plus Flutamid erhöhte die zuvor durch Testosteron reduzierte Sekretionsrate signifikant, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrolle. Darstellung des MW \pm SEM (n = 8). Mit dem Mann Whitney Test ergab sich die folgende Signifikanz: T 10⁻⁷ M vs T 10⁻⁷ M + Fl 10⁻⁶ M, *p < 0,005. C = Cells (Zellen)

Die unbehandelten SK11 Zellen produzierten durchschnittlich 400 pg/ml Gesamt-TGF- β 1. Die TGF- β 1 Konzentration stieg nach zuvor Suppression durch Testosteron (10^{-7} M) bei Zugabe von Flutamid (10^{-6} M) erneut auf das 1,19-fache signifikant an (Abb.20). Damit bewegte sich die Sekretionsrate wieder im Bereich der Kontrolle.

TGF- β 2 Sekretion von SK11 Zellen unter Stimulation mit Testosteron und Flutamid

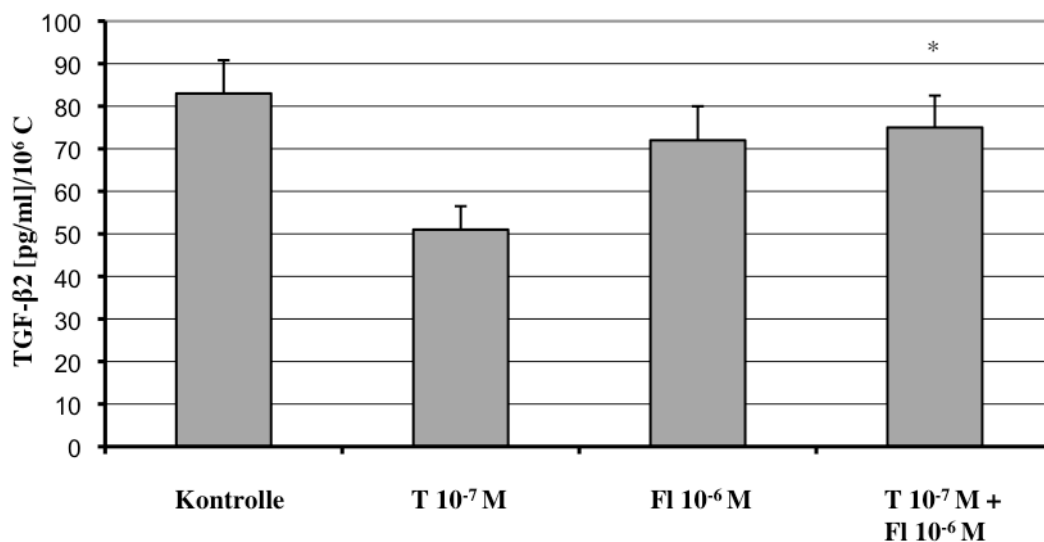


Abb.21: Bestimmung der Gesamtmenge an TGF- β 2 im Medium der Sertolizellen (SK11) nach Stimulation mit Testosteron (T, 10^{-7} M), Flutamid (Fl, 10^{-6} M) und Testosteron (T, 10^{-7} M) plus Flutamid (Fl, 10^{-6} M). Die Behandlung mit Flutamid erhöhte die zuvor durch Testosteron reduzierte Sekretionsrate signifikant. Darstellung des MW \pm SEM (n = 8). Mit dem Mann Whitney Test ergab sich die folgende Signifikanz: T 10^{-7} M vs T 10^{-7} M + Fl 10^{-6} M, p = 0,02. C = Cells (Zellen)

Die Kontrolle zeigte eine durchschnittliche Sekretionsrate von 80 pg/ml TGF- β 2. Durch die zusätzliche Gabe von Flutamid (10^{-6} M) zum Testosteron (10^{-7} M) stieg die zuvor durch Testosteron supprimierte Sekretionsrate auf das 1,47-fache an (Abb. 21).

Zusammenfassung der Ergebnisse der TGF- β 1 und TGF- β 2 Sekretion testikulärer Zellen nach Stimulation mit Testosteron und Flutamid

Die Proliferation der WL3 Zellen, einer Sertoli-Mischkultur, nahm unter Testosteron, als auch Flutamid und Testosteron plus Flutamid, geringfügig zu. Die Proliferationsrate bei einer Stimulation von Testosteron und Flutamid zusammen entsprach ungefähr der Proliferationsrate bei einer Stimulation ausschließlich mit Testosteron. Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen.

Die TGF- β 1-Sekretionsrate der WL3-Zellen stieg nach vorheriger Reduktion durch Testosteron nach Flutamideinwirkung signifikant um 8% auf das 0,97-fache der Kontrolle an.

Auf die TGF- β 2 Sekretion der WL3-Zellen zeigte Flutamid nach supprimierender Wirkung durch Testosteron ebenfalls einen ansteigenden Effekt. Die TGF- β 2 Sekretion stieg nach Reduktion durch Testosteron erneut um 20% auf das 0,99-fache der Kontrolle an.

Die Proliferation der SK11-Zellen, einer reinen Kultur aus Sertolizellen, wurde von Testosteron, Flutamid als auch Testosteron und Flutamid zusammen, positiv beeinflusst. Die Proliferation bei einer Stimulation mit Testosteron und Flutamid zusammen lag mit einer 4% höheren Proliferation im Vergleich zu einer Stimulation mit ausschließlich Testosteron geringfügig höher und kann eher vernachlässigt werden.

Flutamid hob mit einem Anstieg von 19% signifikant die testosteronbedingte TGF- β 1-Suppression der SK11-Zellen auf das 1,01-fache der Kontrolle auf.

Die TGF- β 2 Sekretion der SK11-Zellen wurde nach testosteronbedingter Suppression ebenfalls positiv beeinflusst. Die TGF- β 2 Sekretion stieg im Vergleich zur Sekretionsrate unter Testosteron nach Flutamideinwirkung signifikant um 47% auf das 0,9-fache der Kontrolle an.

Flutamid revidierte die Reduktion der TGF- β Sekretion im geringsten Maße bei der TGF- β 1 Sekretion der WL3-Mischkultur. Die TGF- β 2 Sekretion der WL3-Zellen als auch die TGF- β 1 Sekretion der reinen Sertolizellen (SK11) nahm unter Flutamideinwirkung in annähernd gleichem Ausmaß wieder zu. Am stärksten stieg die TGF- β 2 Sekretion der SK11-Zellen nach testosteronbedingter Suppression durch Flutamid wieder an.

IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DES ANDROGEN-REZEPTORS UND TGF- β 2 IM MENSCHLICHEN HODEN

Die Immunhistochemie ermöglicht die Identifikation verschiedener Proteine und Zellarten durch Antikörperfärbung. Wir testeten Gewebeschnitte verschiedener Biopsien aus dem menschlichen Hoden von gesunden und infertilen Männern. Die Proben wurden jeweils mit einem Antikörper für den Androgenrezeptor und einem Antikörper für TGF- β 2 gefärbt.

Untersuchung des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor gehört zur Familie der steroidalen Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Er bindet mit hoher Affinität und Spezifität zwei biologisch aktive Androgene, das Testosteron und das Dihydrotestosteron (Wilson et al. 1976). Wir untersuchten immunhistochemisch die unterschiedliche Ausprägung des Androgenrezeptors in menschlichen Tubuli seminiferi mit normaler und gestörter Spermatogenese, bei welcher das Sertoli-cell-only-Syndrom eingeschlossen ist. Dabei werteten wir die Androgenrezeptorfärbung der Sertolizellen und die des gesamten Tubulus getrennt voneinander aus (siehe Material und Methoden).

Färbung des Androgenrezeptors im gesamten Tubulus seminiferus

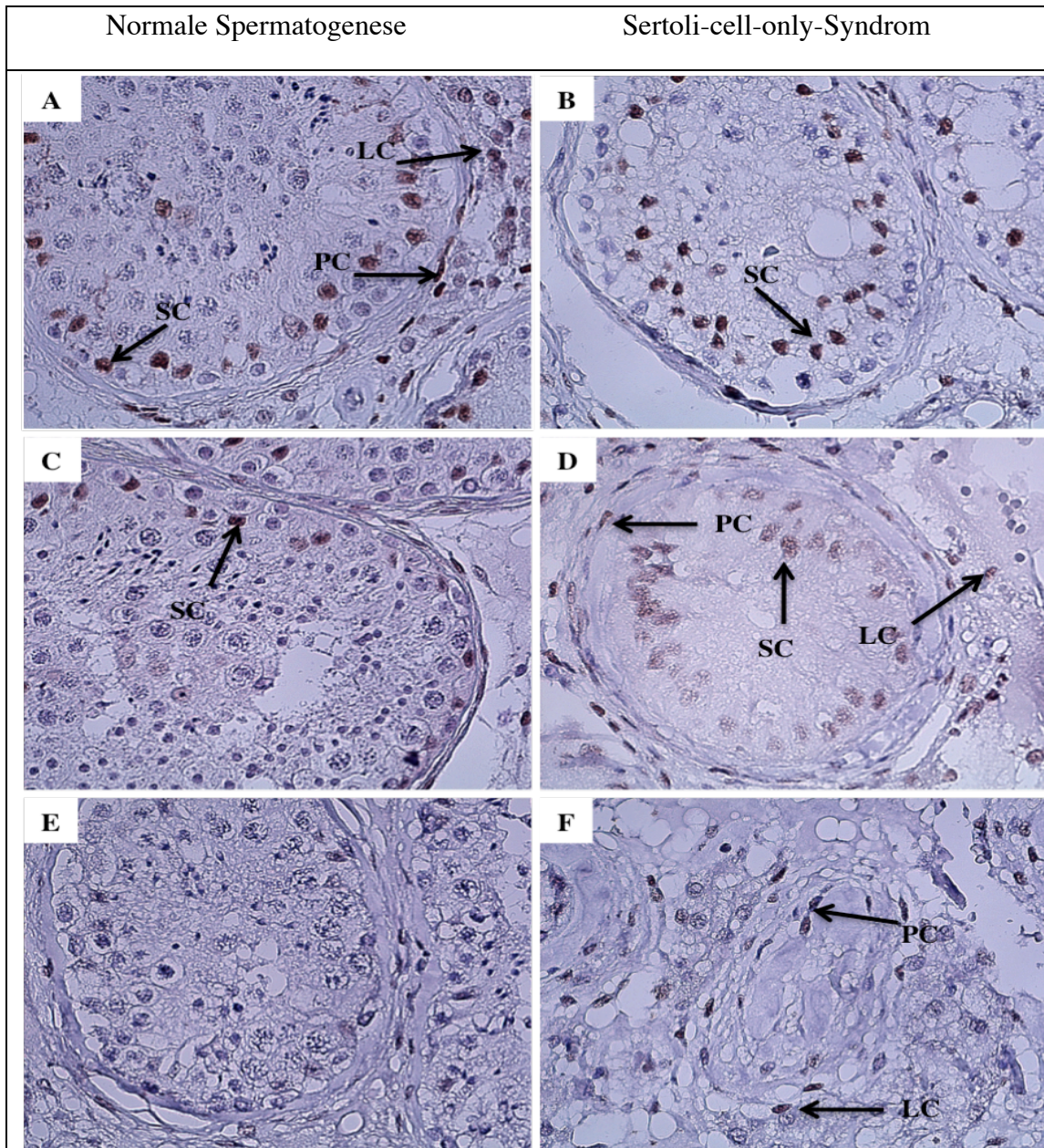


Abb.22: Nachweis des Androgenrezeptors im adulten menschlichen Hoden. Färbung der Sertolizellen (SC), Peritubulärzellen (PC) und Leydig-Zellen (LC): **A:** stärkste Färbung (10) bei normaler Spermatogenese; **B:** stärkste Färbung (10) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **C:** durchschnittliche Färbung (6) bei normaler Spermatogenese; **D:** durchschnittliche Färbung (7) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **E:** niedrigste Färbung (2) bei normaler Spermatogenese, **F:** niedrigste Färbung (2) bei Sertoli-cell-only-Syndrom. Vergrößerung A-F 400x

Die Patientenzahl bei der gestörten Spermatogenese setzte sich zusammen aus Patienten mit Sertoli-cell-only-Syndrom und Patienten mit immaturren Sertolizellen, unreifen Keimschläuchen, Leydig-Zellhyperplasie und Spermatocytenarrest. Wegen der geringen Fallzahl dieser unterschiedlichen Störungen in der Spermatogenese entsprach die Färbung der gestörten Spermatogenese ungefähr der des Sertoli-cell-only-Syndroms. Aus diesem Grund entschieden wir uns gegen eine bildliche Darstellung dieser einzelnen Störungen.

Bei der Auswertung des gesamten Tubulus seminiferus wurden in der normalen Spermatogenese neben den Sertolizellen auch Peritubulärzellen und Leydig-Zellen angefärbt, die nachgewiesenermaßen einen Androgenrezeptor exprimieren. Beim Sertoli-cell-only-Syndrom waren neben Leydig- und Peritubulärzellen vor allem Sertolizellen gefärbt. Die durchschnittliche Farbstärke der markierten Androgenrezeptoren bei der normalen Spermatogenese unterschied sich nicht stark von der Androgenrezeptorfärbung bei dem Sertoli-cell-only-Syndrom (Abb. 23).

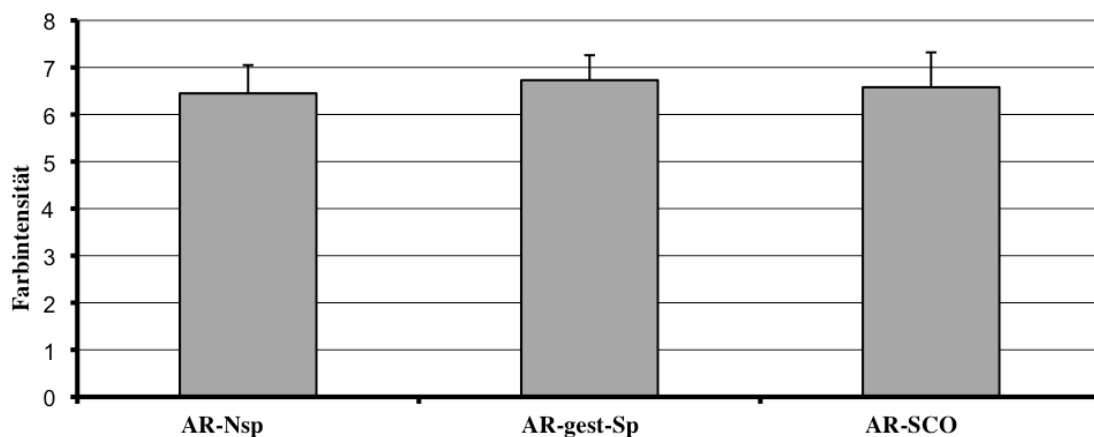


Abb.23: Auswertung der Androgenrezeptorfärbung im gesamten Tubulus seminiferus bei normaler Spermatogenese (AR-Nsp), gestörter Spermatogenese (AR-gest-Sp) und Sertoli-cell-only-Syndrom (AR-SCO). Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 15$; $n_{\text{SCO}} = 8$).

Die Farbintensität lag bei der normalen Spermatogenese auf einer Skala von zwei bis zehn durchschnittlich bei 6,45, während die durchschnittliche Färbung bei gestörter Spermatogenese 6,73 und beim Sertoli-cell-only-Syndrom 6,58 betrug. Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen (Abb. 23).

Färbung des Androgenrezeptors in den Sertolizellen

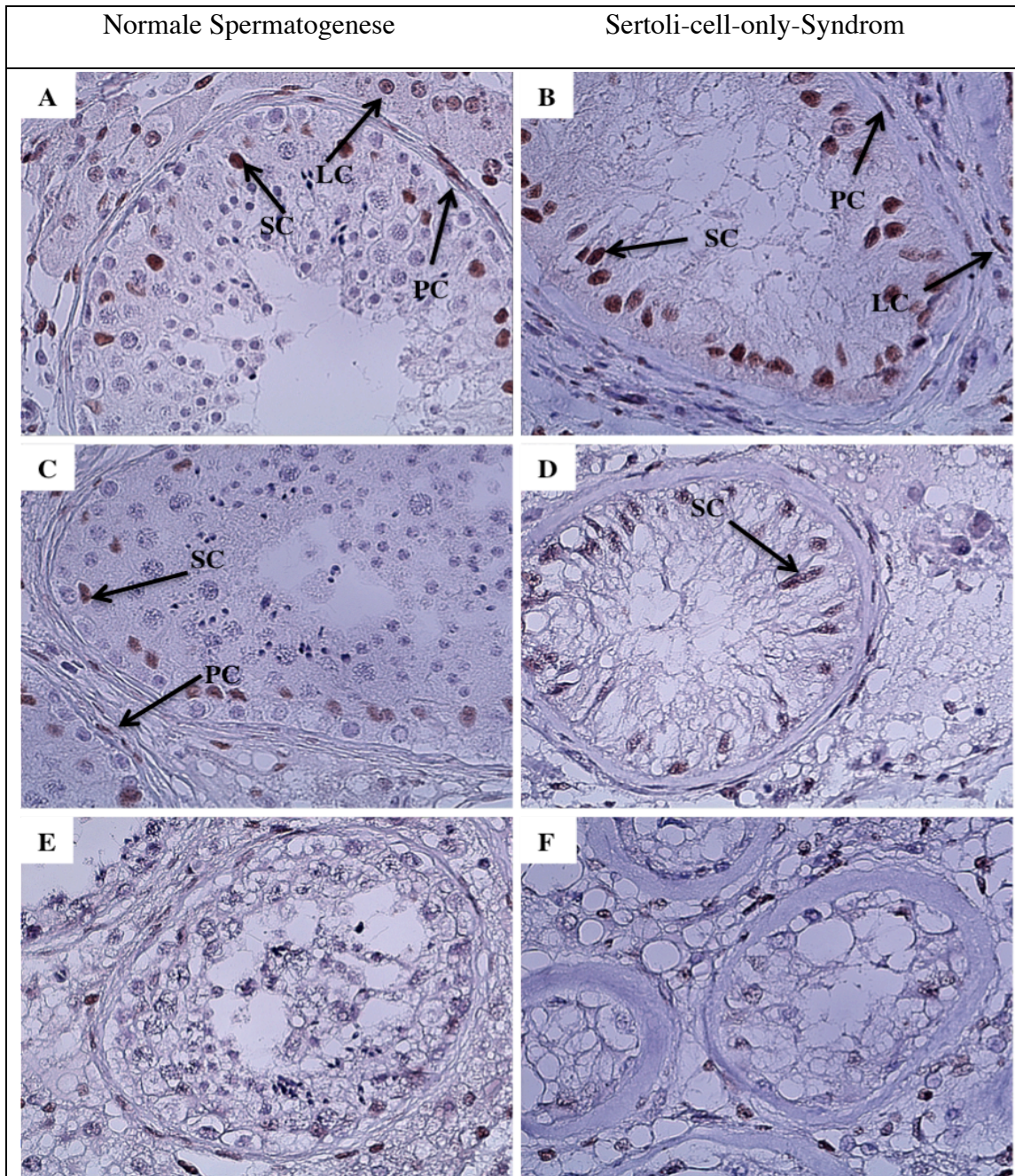


Abb.24: Nachweis des Androgenrezeptors im adulten menschlichen Hoden. Färbung der Sertolizellen (SC), Peritubulärzellen (PC) und Leydig-Zellen (LC): **A:** stärkste Sertolizellfärbung (10) bei normaler Spermatogenese; **B:** stärkste Sertolizellfärbung (10) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **C:** mittlere Sertolizellfärbung (5) bei normaler Spermatogenese; **D:** mittlere Sertolizellfärbung (6) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **E:** geringste Sertolizellfärbung (2) bei normaler Spermatogenese; **F:** niedrigste Sertolizellfärbung (2) bei Sertoli-cell-only-Syndrom. Vergrößerung A-F 400x

Die Patientenzahl bei der gestörten Spermatogenese setzte sich zusammen aus Patienten mit dem Sertoli-cell-only-Syndrom und Patienten mit immaturren Sertolizellen, Keimschläuchen und Spermatocytenarrest. Wegen der geringen Fallzahl dieser unterschiedlichen Störungen in der Spermatogenese entschieden wir uns gegen eine gesonderte Auswertung dieser einzelnen Störungen.

Bei dieser Auswertung wurde nur die Färbung der Sertolizellen beurteilt. Beim Sertoli-cell-only-Syndrom waren die Sertolizellen im Tubulus sehr deutlich gefärbt (Abb. 24B). Die durchschnittliche Farbstärke der markierten Androgenrezeptoren in den Sertolizellen bei der normalen Spermatogenese unterschied sich mäßig von der Androgenrezeptorfärbung in den Sertolizellen bei dem Sertoli-cell-only-Syndrom. Lediglich quantitativ schienen beim Sertoli-cell-only-Syndrom mehr Sertolizellen als bei der normalen Spermatogenese angefärbt zu sein (Abb. 24A vs Abb 24B). Dies war jedoch kein Punkt unserer Auswertung.

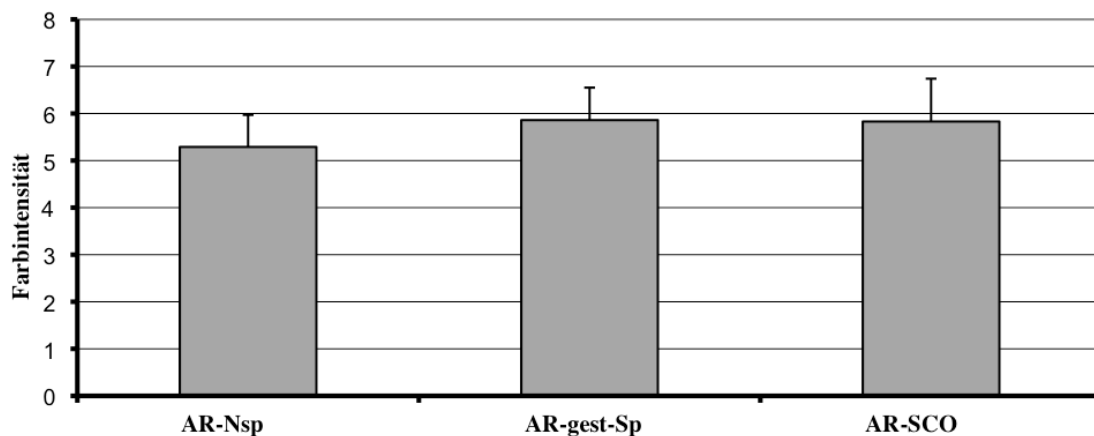


Abb.25: Auswertung der Androgenrezeptorfärbung der Sertolizellen bei normaler Spermatogenese, gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 14$; $n_{\text{SCO}} = 8$).

Die Farbintensität des Androgenrezeptors bei normaler Spermatogenese lag auf einer Skala von zwei bis zehn durchschnittlich bei 5,29, während die durchschnittliche Färbung bei gestörter Spermatogenese 5,86 und beim Sertoli-cell-only-Syndrom 5,83 betrug. Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen (Abb. 25).

Immunhistochemische Untersuchung von TGF- β 2 im Hoden

Bei Säugern konnten bisher drei Isoformen des „transforming growth factor beta“ nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die TGF-betas während der embryonalen Entwicklung viele Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Derynck et al. 1985; deMartin et al. 1987; ten Dijke et al. 1988) und essentiell bei der Morphogenese und Apoptose der Keimzellen sind (Skinner & Moses 1989). Ausgehend von unseren in vitro-Ergebnissen, dass Testosteron die Proteinexpression der TGF-betas herunterreguliert, sollte die Hypothese getestet werden, ob bei Patienten mit einer gestörten Spermatogenese ebenfalls eine veränderte Expression des Androgen-Rezeptors und der TGF-betas vorliegen könnte. Wir untersuchten immunhistochemisch inwiefern sich die Präsenz von TGF- β 2 im menschlichen Hoden bei gestörter Spermatogenese im Vergleich zur normalen Spermatogenese verändert. Dabei konzentrierten wir uns weitgehend auf das Sertoli-cell-only-Syndrom. In der Auswertung der TGF- β 2 Färbung unterschieden wir zwei Gruppen. In der ersten Gruppe wurde die Färbung des gesamten Tubulus seminiferus ausgewertet, während in der zweiten Gruppe die alleinige Färbung der Sertolizellen im Tubulus beurteilt wurde (siehe Material und Methoden).

Färbung von TGF- β 2 im gesamten Tubulus seminiferus

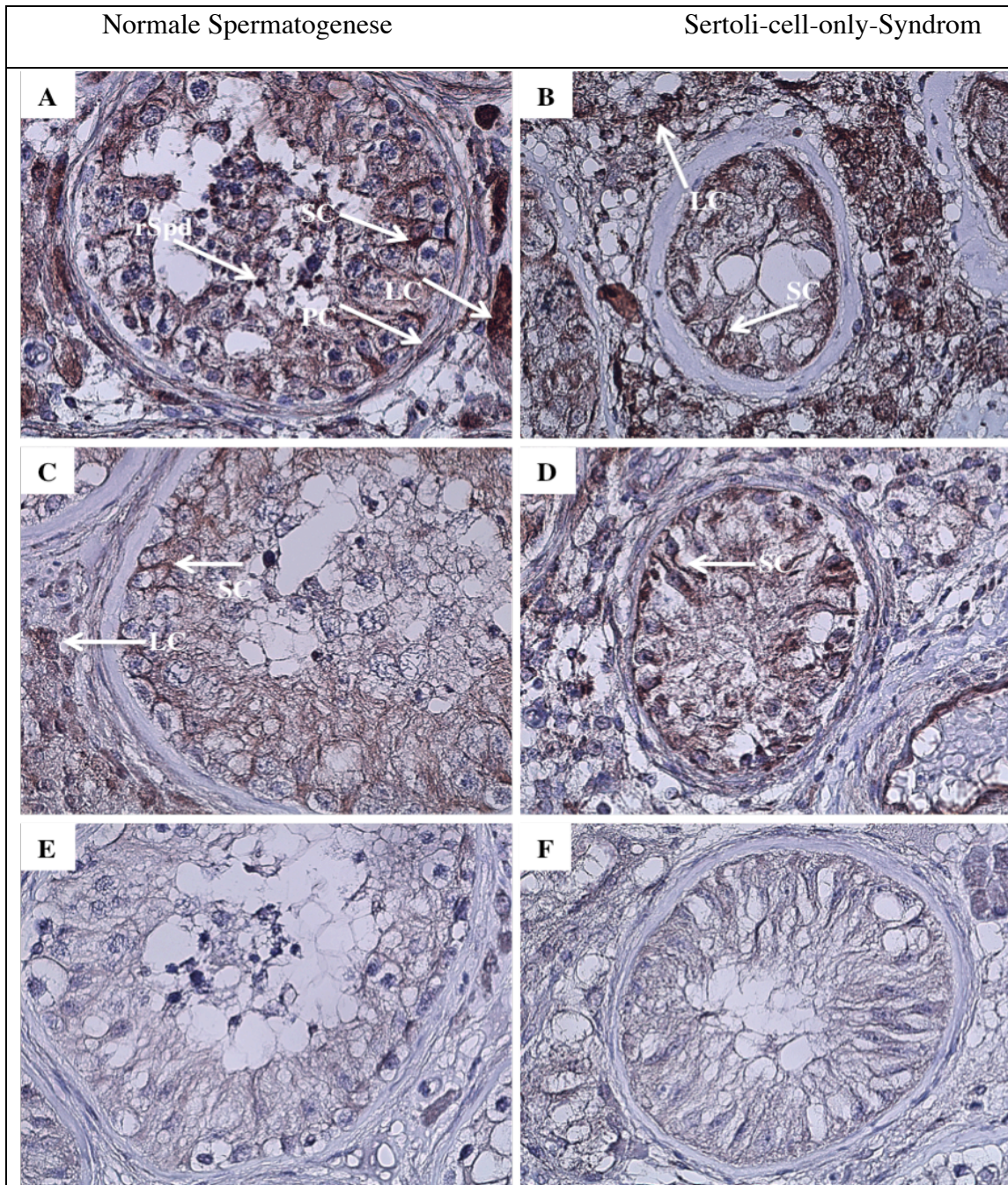


Abb.26: Nachweis von TGF- β 2 im adulten menschlichen Hoden. Darstellung der Färbung in den Sertolizellen (SC), Peritubulärzellen (PC), Leydig-Zellen (LC) und runden Spermatiden (rSpd): **A:** stärkste Färbung (10) bei normaler Spermatogenese; **B:** stärkste Färbung (10) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **C:** mittlere Färbung (6) bei normaler Spermatogenese; **D:** mittlere Färbung (7) bei Sertoli-cell-only-Syndrom; **E:** geringste Färbung (2) bei normaler Spermatogenese; **F:** geringste Färbung (2) bei Sertoli-cell-only-Syndrom. Vergrößerung A-F 400x

Die Patientenzahl der gestörten Spermatogenese setzte sich zusammen aus Patienten mit dem Sertoli-cell-only-Syndrom und Patienten mit immaturren Sertolizellen, Keimschläuchen, Leydig-Zellhyperplasie und Spermatocytenarrest. Wegen der geringen Fallzahl dieser unterschiedlichen Störungen in der Spermatogenese entschieden wir uns gegen eine bildliche Auswertung dieser einzelnen Störungen.

Bei den Patienten mit weitgehend normaler Spermatogenese wurden Sertolizellen, Peritubulärzellen, Leydig-Zellen und runde Spermatiden angefärbt (Abb. 26A). Beim Sertoli-cell-only-Syndrom waren Leydigzellen und Sertolizellen gefärbt (Abb. 26B und Abb. 26D). Die durchschnittliche Färbung von TGF- β 2 bei normaler Spermatogenese war signifikant niedriger als die durchschnittliche TGF- β 2 Färbung bei Sertoli-cell-only-Syndrom und gestörter Spermatogenese (Abb. 27).

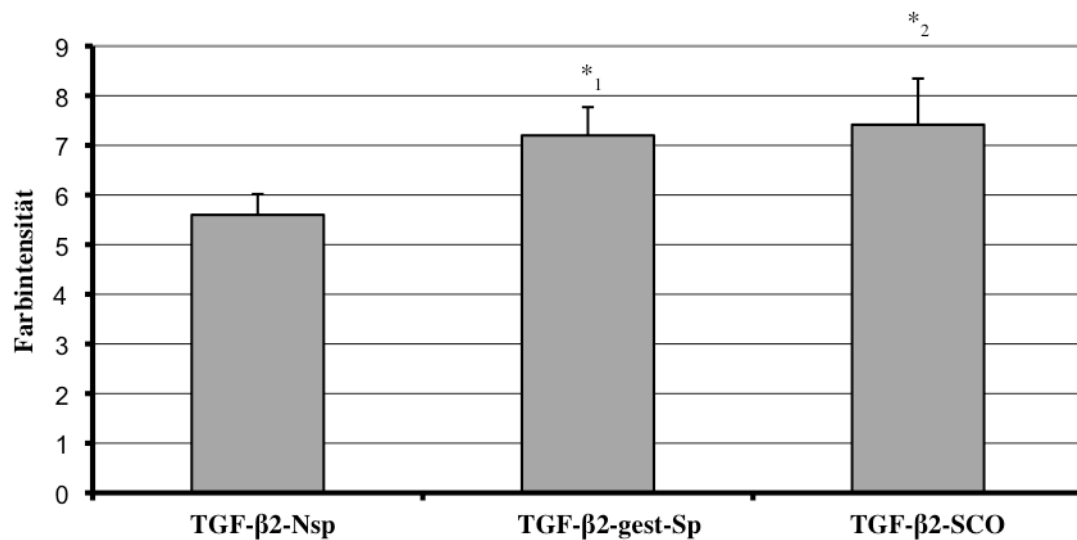
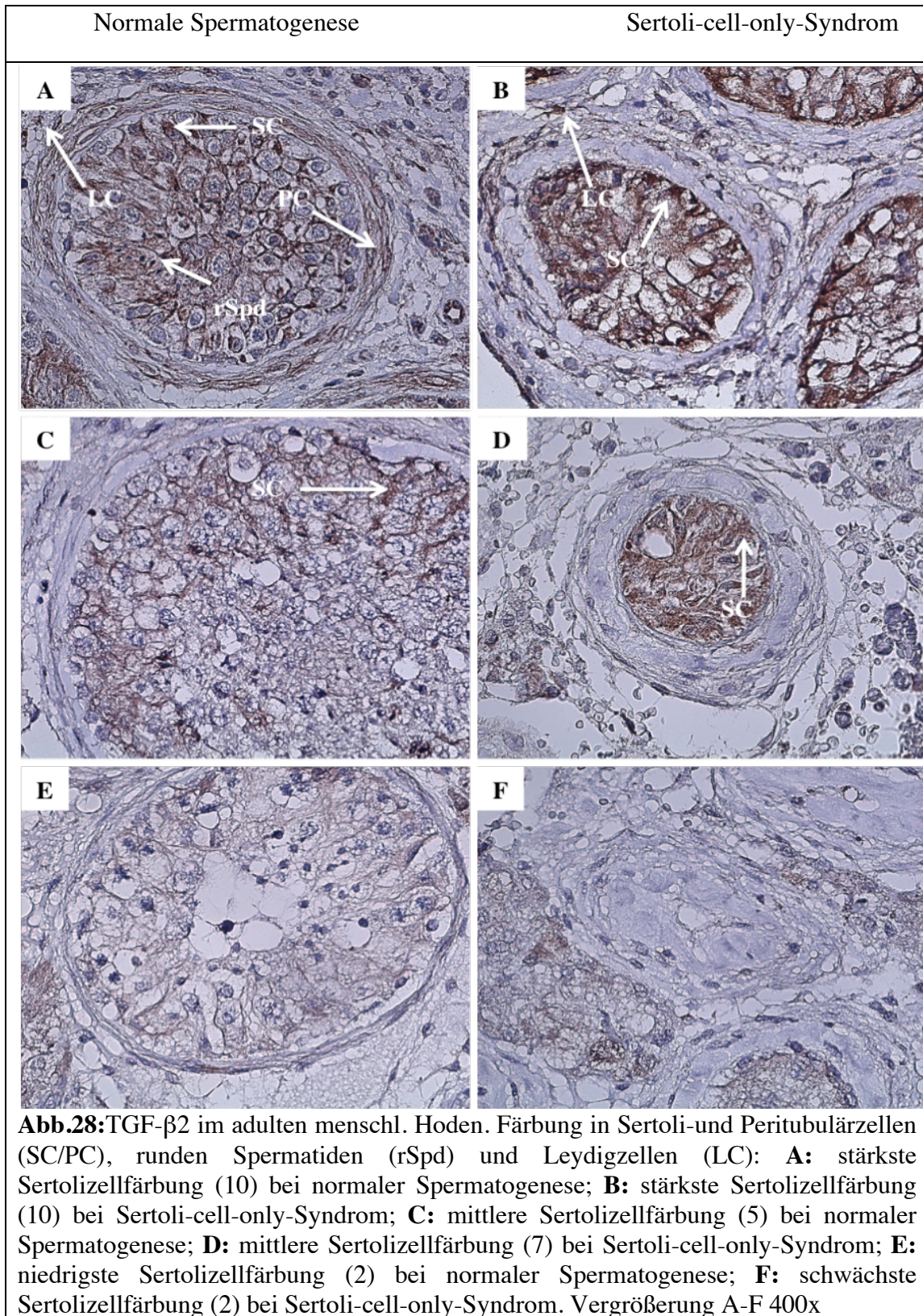


Abb.27: Auswertung der TGF- β 2 Färbung im gesamten Tubulus seminiferus bei normaler Spermatogenese, gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 15$; $n_{\text{SCO}} = 8$). Mit dem Mann-Whitney-Test ergaben sich folgende Signifikanzen: TGF- β 2-Nsp vs TGF- β 2-gest-Sp *₁ $p = 0,0243$, TGF- β 2-Nsp vs TGF- β 2-SCO *₂ $p = 0,0251$

In der Diagrammauswertung zeigte sich eine signifikant stärkere TGF- β 2 Färbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom im Vergleich zur normalen Spermatogenese. Die Farbintensität von TGF- β 2 bei normaler Spermatogenese lag auf einer Skala von zwei bis zehn durchschnittlich bei 5,6 während die durchschnittliche Färbung bei gestörter Spermatogenese 7,2 und beim Sertoli-cell-only-Syndrom 7,416 betrug. Dies bedeutet eine 32% stärkere Färbung im Vergleich zur normalen Spermatogenese (Abb. 27).

Färbung von TGF- β 2 der Sertolizellen



Bei der gestörten Spermatogenese wurden Schnitte von Patienten ausgewertet, bei denen histologisch verschiedenste Störungen entdeckt wurden. Dazu gehörte das Sertoli-cell-only-Syndrom, immature Sertolizellen, Keimschläuche, Leydig-Zellhyperplasie und Spermatocytenarrest. Das Sertoli-cell-only-Syndrom ausgenommen, waren die Fallzahlen für die anderen Störungen der Spermatogenese zu gering um diese einzeln und bildlich auszuwerten. Aus diesem Grund wurden diese unter der Rubrik der gestörten Spermatogenese zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

Bei der normalen Spermatogenese wurden Sertoli-, Peritubulär- und Leydig-Zellen als auch runde Spermatiden angefärbt (Abb. 28A). Beim Sertoli-cell-only-Syndrom waren im Tubulus nur Sertolizellen gefärbt. Die durchschnittliche TGF- β 2 Färbung bei dem Sertoli-Cell-Only-Syndrom war mit einer Farbeintensität von sieben auf einer Skala von zwei bis zehn im Vergleich zur TGF- β 2 Färbung bei normaler Spermatogenese mit einer Farbeintensität von fünf deutlich erhöht (Abb. 28 B-F). Allerdings zeigte sich wegen der hohen Streuung der Werte bei dem Sertoli-cell-only-Syndrom keine Signifikanz (Abb. 29).

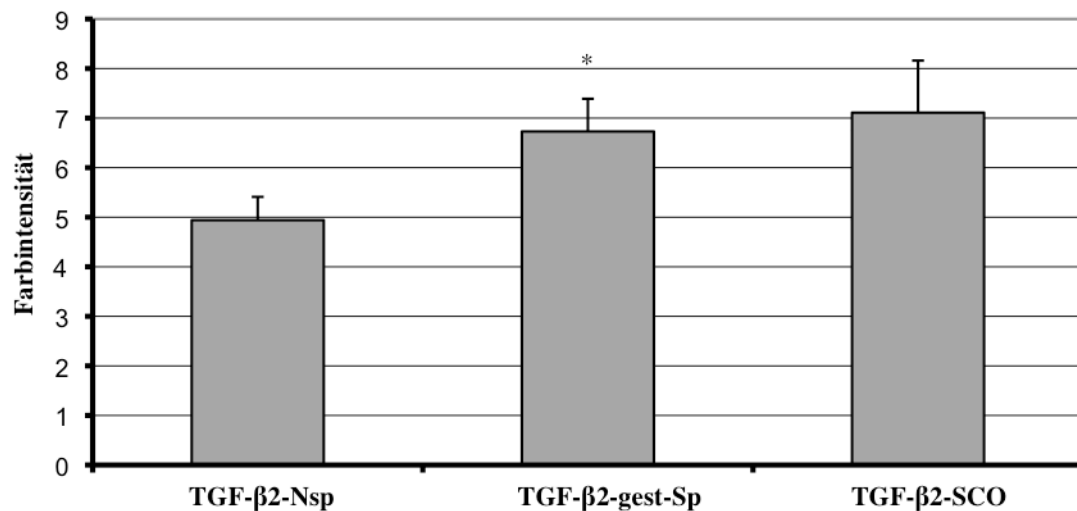


Abb.29: Darstellung der TGF-β2 Färbung der Sertolizellen bei normaler Spermatogenese, gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 14$; $n_{\text{SCO}} = 8$). Mit dem Mann-Whitney-Test ergaben sich folgende Signifikanzen: TGF-β2-Nsp vs TGF-β2-gest-Sp * $p = 0,047$

In der Diagrammauswertung erkannten wir einen signifikanten Anstieg der TGF-β2 Färbung bei gestörter Spermatogenese (6,73) im Vergleich zur TGF-β2 Färbung bei normaler Spermatogenese (4,94). Dies entspricht einer 36% stärkeren Färbung bei gestörter Spermatogenese als bei normaler Spermatogenese. Damit liegt die Färbeintensität bei gestörter Spermatogenese in der Auswertung der Sertolizellen 4% höher als die Färbeintensität bei gestörter Spermatogenese in der Auswertung des gesamten Tubulus. Die TGF-β2 Färbung beim Sertoli-cell-only-Syndrom war ebenfalls deutlich erhöht (7,11). Es ergab sich jedoch wegen der großen Streuung der Werte keine Signifikanz (Abb. 29).

Androgenrezeptorfärbung und TGF- β 2 Färbung im gesamten Tubulus

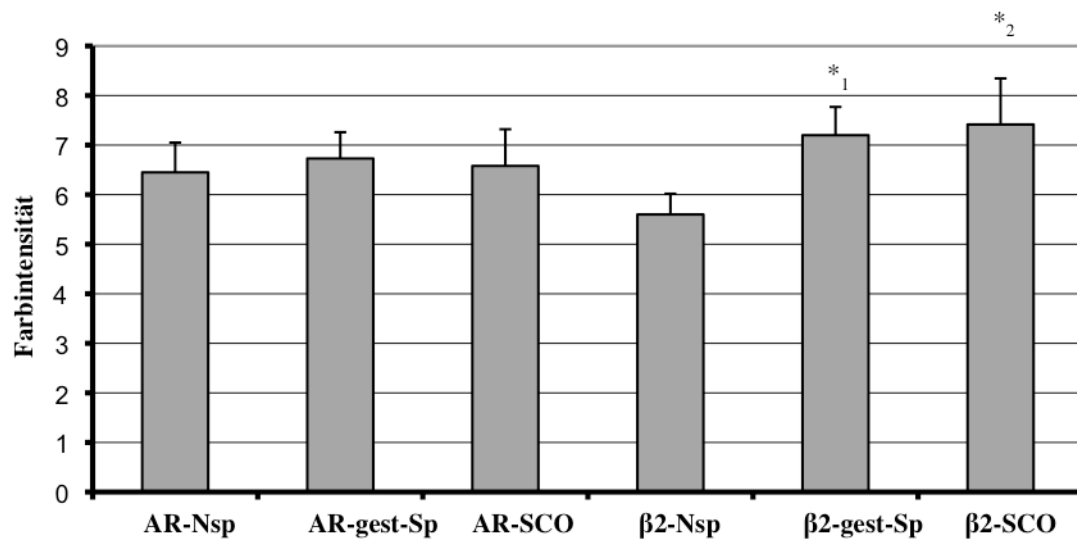


Abb.30: Darstellung der Androgenrezeptorfärbung und TGF- β 2 Färbung im gesamten Tubulus seminiferus bei normaler Spermatogenese, gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 15$; $n_{\text{SCO}} = 8$). Mit dem Mann-Whitney-Test ergaben sich folgende Signifikanzen: β 2-Nsp vs β 2-gest-Sp *₁ $p = 0,0243$, β 2-Nsp vs β 2-SCO *₂ $p = 0,0251$

Bei der Androgenrezeptorfärbung als auch bei der TGF- β 2 Färbung kam es beim Vorliegen der gestörten Spermatogenese und dem Sertoli-cell-only-Syndrom zu einem leichten bis starken Anstieg der Farbintensität. Dieses Ergebnis war bei der TGF- β 2 Färbung im Gegensatz zur Androgenrezeptorfärbung signifikant (Abb. 30).

Androgenrezeptorfärbung und TGF- β 2 Färbung der Sertolizellen

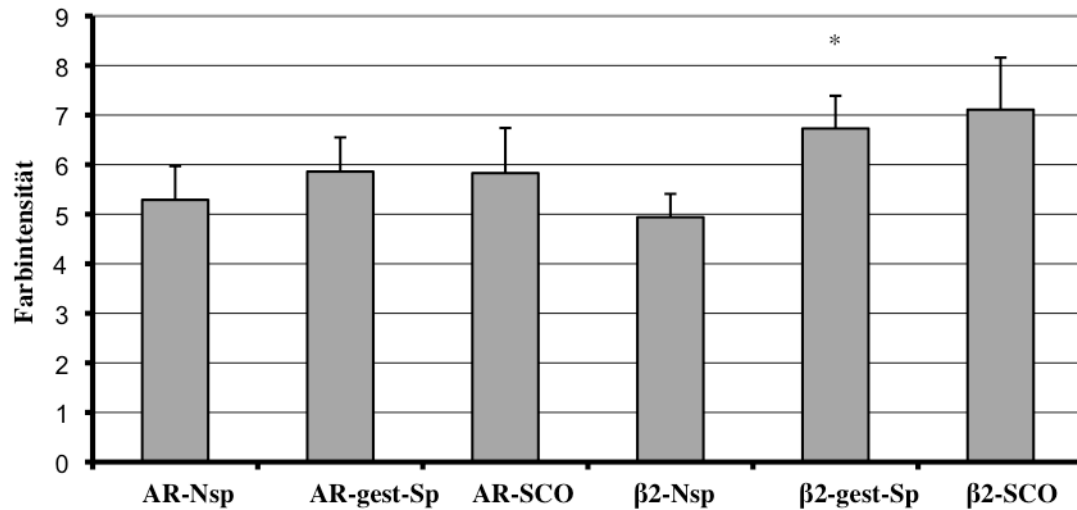


Abb.31: Darstellung der Androgenrezeptorfärbung und TGF- β 2 Färbung der Sertolizellen des Tubulus seminiferus bei normaler Spermatogenese, gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Angabe des MW \pm SEM ($n_{\text{nsp}} = 12$; $n_{\text{gest-Sp}} = 14$; $n_{\text{SCO}} = 8$). Mit dem Mann-Whitney-Test ergaben sich folgende Signifikanzen: β 2-Nsp vs β 2-gest-Sp * $p = 0,047$.

Die Androgenrezeptorfärbung und TGF- β 2 Färbung verstärkte sich bei dem Vorliegen einer gestörten Spermatogenese und eines Sertoli-cell-only-Syndroms. Dieser Anstieg der Farbintensität war bei einem Vergleich der TGF- β 2 Färbung bei normaler Spermatogenese und TGF- β 2 Färbung bei gestörter Spermatogenese signifikant höher. Trotz leichtem Anstieg der Androgenrezeptorfärbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom ließ sich keine Signifikanz feststellen (Abb. 31).

Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse des Androgenrezeptors und TGF- β 2 im menschlichen Hoden

Bei der Auswertung der Androgenrezeptorfärbung im gesamten Tubulus seminiferus als auch der Sertolizellen allein zeigte sich eine leichte Zunahme der Färbung. Dabei unterschied sich die Färbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom nur unwesentlich voneinander. Weder bei der Farbauswertung der Sertolizellen im Tubulus noch bei der Auswertung aller gefärbten Zellen im Tubulus zeigte sich eine Signifikanz. Allerdings ließ sich erkennen, dass der Anstieg der Androgenrezeptorfärbung bei der Auswertung nur der Sertolizellen auf das 1,1fache bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom deutlich stärker war, als die Erhöhung der Androgenrezeptorfärbung im gesamten Tubulus. Hier kam es bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom lediglich zu einer durchschnittlichen Zunahme auf das 1,03fache.

Auch bei der Auswertung der TGF- β 2 Färbung im gesamten Tubulus seminiferus und nur der Sertolizellen kam es zu einem Anstieg der Farbintensität bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Es bestanden nur leichte Unterschiede zwischen der TGF- β 2 Färbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Bei der Auswertung des gesamten Tubulus zeigte sich ein signifikanter Anstieg der TGF- β 2 Färbung bei gestörter Spermatogenese auf das 1,28fache und beim Sertoli-cell-only-Syndrom auf das 1,32fache. Bei der Auswertung der Sertolizellen allein zeigte sich ein signifikanter Anstieg zwischen der TGF- β 2 Färbung bei normaler Spermatogenese von 4,94 Farbpunkten auf 6,73 Farbpunkten bei gestörter Spermatogenese. Das bedeutet eine Erhöhung der TGF- β 2 Färbung auf das 1,36fache.

DISKUSSION

Die TGF-betas sind wichtige Regulatoren von Apoptose und Morphogenese von Keimzellen (Skinner & Moses 1989, Olaso et al. 1998a, Konrad et al. 2006). Sie kontrollieren die Steroidogenese in Leydig-Zellen (Benahmed et al. 1989, Gautier et al. 1997), den Aufbau der Blut-Hoden-Schranke (Lui et al. 2001, 2003a; Xia et al. 2006; Wang & Lui 2009) und die Zell-Zell-Interaktion zwischen Sertoli-Zellen und Myoidzellen (Ailenberg et al. 1990, Konrad et al. 2000). Die TGF-betas und deren Rezeptoren T β RI-III werden im Hoden exprimiert (Lui et al. 2001). Während die Lokalisation von TGF β 1 und - β 3 in Sertoli-Zellen, Spermatocyten und runden Spermatiden sehr ähnlich ist, ist die Expression von TGF- β 2 eher auf spätere Stadien, wie runde und elongierte Spermatiden beschränkt (Teerds & Dorrington 1993; Santamaria et al. 1995; Lui et al. 2003a). T β RI-III werden zusammengefasst in allen spermatogenetischen Stadien exprimiert. Die T β RI Genexpression wird erst in pachytänen Spermatocyten gemessen, jedoch nicht in elongierten Spermatiden ab dem Stadium XIV aufwärts. Die T β RII Genexpression ist schon in Spermatogonien messbar, nimmt ab dem Stadium der pachytänen Spermatocyten mit dem Beginn der T β RI Expression zu, um jedoch in elongierten Spermatiden ab Stadium XI zu verschwinden (Olaso et al. 1998b). Diese unterschiedliche Expression von TGF-betas und deren Rezeptoren während der pubertären Entwicklung des Hodens und in den unterschiedlichen spermatogenetischen Stadien lässt vermuten, dass TGF-betas auf bisher ungeklärte Art und Weise an der Regulation der Spermatogenese beteiligt sind.

Wir untersuchten, in wiefern sich die TGF- β -Sekretion testikulärer Zellen unter dem Einfluss von Testosteron in vitro verändert. Zusätzlich versuchten wir eine Korrelation zwischen der Androgen- und TGF- β -Rezeptorexpression in menschlichen Hodenschnitten bei normaler und gestörter Spermatogenese mittels Immunhistochemie herauszufinden.

EFFEKTE VON TESTOSTERON AUF DIE SEKRETION DER TGF-BETAS IN TESTIKULÄREN ZELLEN

Generell sezernierten die Keimzellen (GC2) am meisten TGF- β 1, knapp danach die Mischkultur (WL3) und am wenigsten die Sertoli-Zellen (SK11). TGF- β 2 wurde am stärksten von der Mischkultur sezerniert. Die Sekretionsrate der Sertoli-Zellen war gering. In der Keimzelllinie (GC2) konnten wir keine TGF- β 2 Sekretion ermitteln. Ausserdem war in der Mischkultur als auch in den Keimzellen keine TGF- β 3 Sekretion nachweisbar. Für die Sertoli-Zellen führten wir keine TGF- β 3 Messung durch.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Mullaney & Skinner (1993) überein. Sie beschreiben, dass alle drei TGF- β -Isoformen von Sertolizellen und Peritubulärzellen exprimiert und sezerniert werden. Für TGF β -1 und TGF β -2 entspricht dies auch unseren Ergebnissen. Zwar beschreiben Lui et al. 2003a eine TGF- β 3 Expression in Sertolizellen, Spermatozyten und runden Spermatiden, TGF β 3 wurde jedoch prinzipiell in sehr wenigen Geweben nachgewiesen. Wir konnten weder in unserer Mischkultur aus Sertoli- und Peritubulärzellen noch in unseren Keimzellen eine TGF- β 3 Sekretion messen. Dies kann an zu häufigem Passagieren der Zellen gelegen haben, womit bestimmte Zelleigenschaften verloren gehen oder an einer zu geringen Sekretionsrate der Zellen, die vom TGF- β 3 ELISA eventuell nicht erfasst wurde. Was jedoch auffällig ist, ist die erhöhte TGF- β 1 und - β 2 Sekretionsrate in der Mischkultur im Vergleich zur Kultur aus reinen Sertolizellen. Dies könnte daran liegen, dass die Mischkultur mit Peritubulärzellen verunreinigt ist, welche neben Spermatozyten nachweislich unter allen testikulären Zellen am meisten TGF- β 2 sezernieren (Konrad et al. 2000; Haagmans et al. 2003). Die erhöhte TGF- β 1 Sekretion in der Mischkultur im Vergleich zu der Sertolizellkultur könnte ebenfalls mit einer zusätzlichen und erhöhten Sekretionsrate der Peritubulärzellen erklärt werden. Haagmans et al. (2003)

beschreiben im weiteren eine TGF- β 1 und - β 2 Sekretion in Keimzellen. Wir konnten jedoch weder TGF- β 2 noch TGF- β 3 in der Keimzelllinie GC2spd(ts) messen, da die Keimzelllinie GC2spd(ts) größtenteils aus Spermatozyten besteht und keine runden oder elongierten Spermatiden vorhanden sind. So konnten wir in unseren immunhistologischen Untersuchungen an Hodenbiopsien eine TGF- β 2 Färbung in runden Spermatiden aufzeigen, jedoch keine Färbung in Spermatozyten. Dies geht konform mit unseren ELISA Messungen für TGF β 2 in GC2spd(ts) und lässt vermuten, dass Haagmanns et al. (2003) keine reinen Keimzellen getestet haben.

Unsere AR-positiven Zellen, die WL3 Mischkultur und die Sertolizelllinie SK11, reagierten auf die Stimulation mit Testosteron mit einer Zellproliferation und reduzierter TGF β 1 und TGF- β 2-Sekretion. Dies war durch Flutamid reversibel, was belegt, dass diese Beobachtung spezifisch auf Testosteron zurückzuführen ist. Die Keimzelllinie GC2 zeigte keine Androgensensitivität. Testosteron hatte weder Einfluss auf die Zellproliferation noch auf die TGF- β 1-Sekretion.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Gruppen, die sich mit der Regulation der Spermatogenese beschäftigen. Man ist sich inzwischen einig, dass TGF- β eine wichtige Rolle dabei spielt. Inwiefern TGF- β beteiligt ist oder reguliert ist, weiss man hingegen noch nicht.

Unseren Versuchen zur Folge werden TGF- β 1 und - β 2 in Sertoli- und Sertoli-ähnlichen Zellen selektiv durch Testosteron inhibiert. Dies war in Keimzellen nicht nachweisbar, da diese keinen AR exprimieren. Die Testosteronkonzentrationen entnahmen wir aus der Studie von Sneddon et al. (2005), welche eine maximale AR-Expression in SK11 Zellen bei einer Stimulation mit Testosteron 10^{-7} M feststellten. Dabei konnten wir die Androgenstimulierbarkeit der WL3- und SK11 Zellen bestätigen.

Vergleichbare Beobachtungen machten Mullaney & Skinner (1993). Sie isolierten Peritubulär- und Sertolizellen aus prä-, mittel- und spätpubertären Rattenhoden und untersuchten die unterschiedliche Entwicklung der mRNA Expression der TGF-betas. Dabei zeigte sich, dass TGF- β 1 und - β 2 im immaturren Hoden vorherrschend waren und mit dem Beginn der Pubertät, also der Zunahme an Testosteron, abnahmen. TGF- β 3 hingegen zeigte seine höchste Expression mit Beginn der Pubertät. Damit würden sich TGF- β 1 und - β 2 im Vergleich zu TGF- β 3 genau gegensätzlich verhalten und TGF- β 3 könnte eine Rolle bei der Initiation der Spermatogenese spielen. Die Expression von TGF- β 1-3 nahm in Peritubulärzellen während der pubertären Entwicklung ab, während die TGF- β 1 mRNA Expression in Sertolizellen jedoch leicht zunahm und während der Pubertät konstant blieb. Die TGF- β 2 Expression war nur in immaturren präpubertären Sertolizellen nachweisbar und die TGF- β 3 Expression in Sertolizellen nahm vorübergehend mit dem Beginn der Pubertät zu, wie es schon in der gesamten testikulären Entwicklung beobachtet wurde.

Unsere Beobachtungen sind vergleichbar mit denen von Mullaney & Skinner (1993) während der testikulären Entwicklung in der pubertären Phase. Im immaturren Rattenhoden bestand die höchste Expression von TGF- β 1 und - β 2 mRNA. Mit dem Beginn der Pubertät bzw. der Zunahme an Testosteron sank diese (Mullaney & Skinner 1993). Studien zu In situ Hybridisierung nehmen an, dass TGF- β 2 vor allem vom mesenchymalen Zelltyp exprimiert wird (Pelton et. al 1989). Dies korreliert mit unseren Ergebnissen. Während die Konzentration von TGF- β 2 in der Sertoli-Zell-Kultur (SK11) am geringsten war, war sie in der Mischkultur (WL3) am höchsten. Die Abnahme von TGF- β 2 im Rattenhoden erklären sich Mullaney & Skinner (1993) zum einen mit dem Umbau von mesenchymalen in epitheliale Zellen, assoziiert mit der Sertoli-Zell-Differenzierung. Denn man geht davon aus, dass sich die Sertoli-Zelle vom gleichen Mesenchymvorläufer ableitet wie die peritubuläre Zelle während der fetalen Keimdrüsenentwicklung (Lording & de Kretser 1972). Zum anderen vermuten Mullaney & Skinner (1993), dass TGF- β 2 in der präpubertären Phase als

Wachstumsinhibitor für Keimzellproliferation- und Entwicklung wirken könnte und mit seiner Abnahme andere Wachstumsfaktoren wie TGF α stimulieren und damit das Keimzellwachstum initiieren könnte. Um die TGF- β Genexpression mit der Proteinproduktion zu korrelieren, führten Mullaney & Skinner (1993) Immunoblot Analysen durch. Die Ergebnisse konnten hier nicht reproduziert werden. Mullaney & Skinner (1993) erklären sich dies damit, dass Zellen in Kultur eine Reihe von TGF- β Wirkformen produzieren und das Ausmaß der TGF-Wirkformen vom Zelltyp und den Kulturbedingungen abhängig ist. Damit könne die von ihnen durchgeführte Immunoblot Analyse nicht alle TGF- β Isoformen erfassen. Zusätzlich produzieren Peritubulärzellen und Sertolizellen Plasminogen Aktivator Inhibitor, der die TGF- β Aktivierung inhibiert. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Downregulation der AR-Aktivität in vitro durch Acetylierung oder Methylierung sein, wie es auch schon in der Prostata beobachtet wurde (Kang et al. 2002). Die Immunoblot Analyse von Mullaney & Skinner (1993) zeigte aber auf, dass TGF- β 1 die von TGF α induzierte DNA-Synthese der Peritubulärzellen in jedem Stadium der Pubertät inhibiert. Im Gegensatz dazu kam es unter Einfluss von TGF- β 1 weder zur Stimulierung noch Inhibierung der Synthese von Sertoli-Zell-DNA oder Sertoli-Zell-Wachstum. In jedem Fall implizieren diese Beobachtungen, dass TGF-betas eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Zell-Zell-Interaktion, testikulären Entwicklung und Spermatogenese spielen (Mullaney & Skinner 1993).

Desai & Kondaiah (2000) untersuchten die TGF- β 1 und - β 2 Expression in Nebenhoden und Samenblase nach Orchiektomie und stellten eine Zunahme der Expression fest, die nach Testosteroninjektion reversibel war. Diese Studien unterstützen demzufolge unsere These, dass eine balancierte TGF- β 1 und - β 2 Sekretion im komplexen Mechanismus der testikulären Entwicklung als auch bei der Initiation der Spermatogenese von Nöten ist und durch Testosteron reguliert sein könnte.

So zeigt sich, dass die massive Apoptose von Keimzellen während der postnatalen testikulären Entwicklung während der ersten Phase der Spermatogenese bis zum Eintritt in die Pubertät durch TGF- β getriggert sein könnte (Pentikainen et al. 2003, Konrad et al. 2006). Studien zeigen, dass eine Überexpression von TGF- β 1 zur testikulären Atrophie führt (Sanderson et al. 1995, Narula et al. 2002) und TGF- β 1 die Metaphase I in der Spermatogenese verstärken kann, die 1. meiotische Teilung jedoch inhibiert (Damestoy et al. 2005). Wir stellen die Hypothese auf, dass der erhöhte TGF- β -Spiegel bei Beginn der natürlichen Keimzellapoptose im Hoden durch den niedrigen Androgenspiegel bis zur Pubertät bedingt sein könnte.

Während der Spermatogenese müssen sich die Sertoli Zell Tights Junctions, welche die Blut Hoden Schranke bilden, teilweise öffnen und dann wieder schließen, um die Translokation von präleptotänen und leptotänen Spermatocyten in den Stadien VIII und IX durch die Barriere zu ermöglichen (de Kretser & Kerr 1988; Russell et al. 1990; Cheng & Mruk 2002). Dieser Prozess ist bis heute auf biochemischer und molekularer Ebene erst ansatzweise verstanden. Studien zeigen aber, dass die Wanderung von Keimzellen durch die testikuläre Barriere von der Beteiligung von Proteasen, Proteaseinhibitoren und Komponenten des junctionalen Komplexes abhängig sind. Diese wiederum sind durch Zytokine und Signalmoleküle reguliert (Nargolwalla et al. 1990; Byers et al. 1993, Mruk & Cheng 2000, Cheng & Mruk 2002). Zum Beispiel zeigten Lui et al. (2001), dass der Aufbau der Sertoli Zell Tight Junctions in vitro mit einem Abfall der endogenen TGF- β 2 und - β 3 Expression der Sertolizellen verbunden ist. Der Signalweg über welchen TGF- β 3 die Regulation der Tight Junctions kontrolliert, ist bisher unbekannt.

Eine neuere Studie von Lui et al. (2003a) zeigt, dass TGF- β 3 in seiner Rolle als Regulator der Sertoli Zell Tight Junctions über den MEKK2/p38MAP Kinase Weg wirken könnte, jedoch nicht über den Smad2 Signalweg. Allerdings kann TGF- β 3

nicht das einzige Zytokin in der Regulation von Aufbau und Abbau der Blut-Hoden Schranke sein. So wirkte es zwar bei exogener Zufuhr störend auf die Sertoli Zell Tight Junction Barriere, konnte ihren Aufbau jedoch in vitro nicht blockieren (Lui et al. 2003a). Beobachtungen von Lui et al. (2003a) beschreiben, dass der TGF- β 3 Spiegel nach Ausbildung der Blut Hoden Schranke erhöht bleibt, was annehmen lässt, dass eine kurzzeitige Reduktion von TGF- β 3 zum Aufbau der Tight Junction Barriere nötig ist, jedoch eine erhöhte TGF- β 3 Konzentration für den Erhalt der Sertolizell-Kontakte erforderlich ist. Wir vermuten, dass die Reduktion der endogenen TGF- β 2 Konzentration beim Aufbau der Blut-Hoden-Schranke durch den pubertären Testosteronanstieg induziert sein könnte. Dies würde eine Störung der Blut Hoden Schranke bei Testosteronentzug besser verstehbar machen.

Ergänzend gibt es ebenfalls unterschiedliche Ansichten über den Einfluss von Testosteron auf die TGF-betas in zum Beispiel prostatischen Zellen. Während Itoh et al. (1998) einen Anstieg von TGF- β 1 und TGF- β 2 in 60 Tage alten Ratten nach Kastration in vivo demonstrieren, meinen sie, dass kein Testosteron-abhängiger Effekt auf TGF- β in kultivierten prostatischen Zellen zu erkennen sei. Dies begründen sie mit der Vermutung, dass die Beobachtungen in vivo auf ein komplexes Netzwerk von Wachstumsfaktoren zurückzuführen sei und nicht allein auf den Androgenentzug. Allerdings muss man hinzufügen, dass Zellen in Kultur oftmals gering Androgen-abhängig sind. Dies kann man auf die Inaktivierung des AR bei fortgeschrittenen Passagen zurückführen. Außerdem haben nicht alle Zelllinien alle Eigenschaften der menschlichen Prostatazellen in vivo. So fehlt die Stroma-Epithel-Interaktion und es kann Unterschiede hinsichtlich der Expression des Androgenrezeptors geben. Die Zellen, die wir verwendeten, benötigten zum Wachstum kein Testosteron, sie waren also teilweise androgenunabhängig, jedoch war die Zellproliferation durch Testosteron stimulierbar.

ANALYSE DER AR UND TGF- β 2 LOKALISATION BEI INFERTILEN PATIENTEN

Es zeigte sich eine AR-Färbung in Sertoli-Zellen, Peritubulärzellen und Leydig-Zellen. Die Intensität der AR-Färbung im gesamten Tubulus seminiferus unterschied sich nicht von den Sertoli-Zellen. In beiden Fällen war die AR-Färbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom im Vergleich zur normalen Spermatogenese nicht signifikant leicht erhöht.

Es zeigte sich eine TGF- β 2-Färbung in Sertoli-Zellen, Peritubulärzellen, Leydig-Zellen und runden Spermatiden. Die TGF- β 2-Färbung bei der Auswertung des gesamten Tubulus war bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom im Vergleich zur normalen Spermatogenese signifikant erhöht. Bei den Sertoli-Zellen zeigte sich ebenfalls eine verstärkte TGF- β 2-Färbung bei gestörter Spermatogenese und Sertoli-cell-only-Syndrom. Diese Beobachtung war hingegen nur bei gestörter Spermatogenese im Vergleich zur normalen Spermatogenese signifikant.

Wir konnten bei den immunhistochemischen Färbungen an Hodenschnitten feststellen, dass die Patienten, die ein Sertoli-cell-only-Syndrom aufwiesen, eine gesteigerte Expression von TGF- β 2 zeigten. Ähnlich war dies bei Tubulusschnitten mit einer generell gestörten Spermatogenese. Zusammenfassend bedeutet dies, dass eine erhöhte TGF- β 2-Färbung mit gestörter Spermatogenese korreliert. Es lässt sich vermuten, dass unsere in vitro-Ergebnisse der Induktion der Keimzellapoptose durch TGF- β (Konrad et al. 2006) auch in vivo stimmen könnten. Einen Zusammenhang zum AR konnten wir in der IHC jedoch nicht klären.

Über den Zusammenhang zwischen Testosteron-induzierter AR-Aktivierung und einem "cross-talk" mit dem TGF- β -Signalweg in testikulären Zellen gibt es bisher noch keine Studien. Allerdings haben bereits viele Gruppen an diesem möglichen Zusammenhang mit prostatistischen Zellen mit dem klinischen Bezug auf das

fortgeschrittene und hormonrefraktäre Prostata Karzinom geforscht. Diese Studien sollen den Grundstein für eine Überleitung dieses Forschungsthemas in testikulären Zellen sein mit dem Ziel die Rolle und Funktionsweise von TGF- β während der testikulären Entwicklung besser verstehen zu lernen und in der Infertilitätsforschung anwenden zu können.

Die meisten Autoren stimmen darin überein, dass das TGF- β -Signal und die intrazellulären TGF- β -Signaleffektoren (Smad3, 4) als negative Regulatoren der AR-vermittelten Transkription in Prostatakrebs-Zellen wirken (Hayes et al. 2001, Chipuk et al. 2002, Kang et al. 2002, Van der Poel et al. 2005).

Kang et al. (2002) stellten fest, dass PC3-AR Zellen und LNCaP-mtAR Zellen bei einer Co-Transfektion mit Smad 3 und 4 eine verminderte AR-Transaktivierung aufzeigten. Dies begründeten sie mit der These, dass der Smad3/4-Komplex den Acetylierungsgrad des AR reduziert und damit auch seine Aktivität. Außerdem beschreiben Kang et al. (2002) einen Smad 4-DBD & LBD-AR-Komplex, der in An- und Abwesenheit von DHT zu Stande kommt, welcher im Gegensatz zum Smad3-AR-Komplex inhibierend, sowohl auf die AR-Transaktivierung als auch die PSA-Expression wirkt. Sie stellten die These auf, dass Smad3 und Smad4 um dieselbe Bindungsstelle am AR konkurrieren. Smad4 hat dabei anscheinend eine höhere Affinität zur AR Bindungsstelle als Smad3. Diesem Modell zur Folge würde die AR-Transaktivierung abhängig von den unterschiedlichen Interaktionen zwischen AR, Smad3 und Smad4 und dessen Verfügbarkeit reguliert.

Chipuk et al. (2002) berichteten, dass DHT inhibierend auf die TGF- β 1-Aktivierung in LNCaP mit oder ohne T β RI und T β RII wirken. Ihre These ist, dass Smad3 im Widerspruch zu Kang et al. (2002) zelllinienspezifisch an der LBD-AR bindet und damit die Bindung von Smad an SBE verhindert und die Signalkaskade somit unterbricht.

Einen ähnlichen aber neuen Ansatz analysierten Wang et al. (2004). Sie beobachteten, dass eine erhöhte AR-Transkription, bedingt durch verstärktes ARA55, zu einer Minderung der TGF- β -vermittelten Transkriptionsaktivität in LNCaP-mtAR führe. Dies ist dadurch bedingt, dass ARA55 durch Bindung des C-Terminus mit der MH2 Region von Smad3 das SBE inhibiert. Im Gegensatz zu Chipuk et al. (2002) und Kang et al. (2001, 2002) glauben Wang et al. (2004) nicht, dass LB-AR an der Inhibition der TGF- β -vermittelten Transkriptionsaktivität beteiligt ist.

Van der Poel (2005) unterstützt die These, dass eine erhöhte AR-Expression die TGF- β 1/Smad Transkriptionsaktivität in PC3-AR Zellen reduziert. Als möglichen Mechanismus der Progression des PCA stellt er die These auf, dass eine AR-Überexpression in den prostatistischen Zellen den wachstumsinhibierenden TGF- β 1-Effekt auch in Abwesenheit von DHT überwindet. Außerdem zeigt er wie Hayes et al. (2001) und Kang et al. (2002) auf, dass eine TGF- β 1 Inkubation der PC3-AR Zellen eine Minderung in der AR-Transkriptionsaktivität bewirkt. Dieser Effekt von TGF- β 1 wird durch DHT verstärkt. Allerdings beschreibt Van der Poel et al. (2005) nicht welches Smad betroffen ist. Dies wäre in Anbetracht der unterschiedlichen Beobachtungen, dass Smad3, Smad4 oder Smad3 und Smad4 zusammen regulierend auf die AR-Transaktivierung wirken, wichtig gewesen.

Hayes et al. (2001) zeigten, dass Smad3 durch Bindung seiner MH2 Domäne an die TAD-AR unter Beeinflussung von MH1-Smad3 bindet und damit die AR-vermittelte Transkriptionsaktivität inhibiert. Dieser Effekt soll durch Smad4 verstärkt und durch Smad7 verringert werden. Dabei geben Hayes et al. (2001) an CV-1-AR-Zellen und PC3 Zellen verwendet zu haben, beschreiben jedoch nicht, welche Beobachtung sie in welchen Zellen gemacht haben. Außerdem geben sie nicht an, ob sie die verwendeten PC3 Zellen, welche normalerweise androgenunabhängig sind und keinen AR besitzen, zuvor mit einem AR exprimiert haben. Damit sind diese Beobachtungen nur eingeschränkt nützlich für ergänzende Versuche dieses Thema betreffend.

Tabelle 3: Auswahl einiger Studien, die unsere Hypothese untermauern

Studie	Ergebnisse
Kang et al. (2002)	Cotransfektion von Smad3&4 wirkt durch Veränderung des Acetylierungsgrads von AR hemmend auf die AR-Transaktivierung.
Chipuk et al. (2002)	DHT inhibiert die TGF- β 1 Aktivierung durch Unterdrückung der Bindung von Smad3 am SBE.
Wang et al. (2004)	Verstärktes ARA55 führt durch Störung der Smad3 Bindung zu einer Inhibition der TGF- β -vermittelten Transkriptionsaktivität.
Van der Poel (2005)	Nach TGF- β 1 Inkubation kommt es zur Inhibition der AR-Transkriptionsaktivität.
Hayes et al. (2001)	Smad3 bewirkt durch Bindung am AR eine Inhibition der AR-vermittelten Transkriptionsaktivität. Dies wird durch Smad4 verstärkt und Smad7 inhibiert.

Die oben beschriebenen Studien unterstützen unsere These, dass androgene Signale inhibierend auf die TGF- β Kaskade bzw. Expression wirken und umgekehrt. Folgende Studien machten hingegen andere Beobachtungen.

Kang et al. (2001) beschrieben, dass eine erhöhte Smad3 Expression in PC3-AR Zellen und LNCaP-mtAR Zellen eine Steigerung der AR-Transaktivierung bewirkt. Sie fanden heraus, dass die DBD- und LBD-AR mit der MH2-Region von Smad3 interagiert. Die dabei vermittelte Steigerung der AR- und PSA-Transaktivierung sei durch DHT verstärkbar, jedoch nicht allein durch DHT induzierbar. Diese Beobachtung relativierten sie 2002 wie oben beschrieben.

Bruckheimer & Kyprianou (2001) stellten fest, dass die proapoptotische Wirkung von TGF- β und Caspase 1 in LNCaP-T β RII Zellen durch überphysiologische Androgenzufuhr verstärkt wird. Sie beschreiben einen positiven Zusammenhang zwischen Androgen und TGF- β .

Zhu et al. (2008) beobachteten, dass das TGF- β Signal in LNCaP-T β RII und PC3-AR eine Steigerung der AR-vermittelten Transkriptionsaktivität in androgen-responsiven Promotoren wie Probasin und PSA über eine Smad4-AR-Interaktion bewirkt. Sie schlussfolgern, dass Verstärkung oder Inhibition von Apoptose durch DHT vom AR-Status abhängig ist. Zhu et al. (2008) zur Folge wirkt der wt-AR als Inhibitor der TGF- β -induzierten Apoptose, während der mt-AR als Verstärker der Apoptose wirkt.

Auch Guo & Kyprianou (1999) zeigten auf, dass ein unterschiedlicher Rezeptorstatus unterschiedliche Effekte bewirken kann. Sie beobachteten, dass eine erhöhte Aktivität von wt-T β RII in LNCaP Zellen im Gegensatz zum mt-T β RII eine erhöhte TGF- β Antwort bewirkt und damit zu einer erhöhten Apoptoserate führt

Tabelle 4: Auswahl einiger Studien, die unsere Hypothese widerlegen

Studien	Ergebnisse
Kang et al. (2001)	Smad3 verstärkt durch AR-Bindung die AR-vermittelte Transaktivierung. Dies ist durch DHT verstärkbar.
Bruckheimer & Kyprianou (2001)	Physiologisch konzentriertes DHT verstärkt die proapoptotische Wirkung von TGF- β .
Zhu et al. (2008)	TGF- β verstärkt über Smad4-AR-Interaktion die AR-vermittelte Transkriptionsaktivität.

Zusammenfassend gibt es unterschiedliche Studienergebnisse, inwiefern der „cross talk“ zwischen dem TGF- β Signal und der AR-Transaktivierung reguliert ist. Allen Studien gemeinsam ist jedoch, dass es anscheinend zu einer Bindung zwischen Smad und AR kommt. Unklar sind die Bindungsdomänen und ob Smad3 und/oder Smad4 dabei involviert sind. Unseren Ergebnissen zur Folge ist das TGF- β Signal negativ durch Androgene reguliert. Wir gehen mit der Beobachtung von Kang et al. (2002) konform, dass die AR-Transaktivierung abhängig von dessen Acetylierungsgrad sein könnte, was durch eine unterschiedliche Smad3/Smad4 Konformation unterschiedlich reguliert sein könnte. Schlussendlich ist dies ein noch weiter zu erforschendes Gebiet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der Spermatogenese beruht auf einem komplexen Netzwerk an endokrinen, parakrinen und zellulären Mediatoren. Der genaue Ablauf der Spermatogenese ist detailliert bekannt, doch trotz intensiver Forschung ist bis heute die genaue Regelung unbekannt. Viele Gruppen versuchten in vitro-Systeme zur Kultivierung von Keimzellen zu entwickeln und so zur Klärung der regulierenden Mechanismen beizutragen. Es ist bis heute jedoch nicht möglich, Keimzellen in vitro bis zu elongierten Spermatiden oder Spermatozoen zu kultivieren.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe als auch anderer Gruppen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TGF- β und die durch TGF- β induzierte Apoptose von Keimzellen bei Eintritt in die Pubertät eine essentielle Rolle in der Spermatogenese hat. In dieser Arbeit versuchten wir herauszufinden, ob die TGF- β Sekretion eventuell Androgen reguliert sein könnte.

Über einen Zeitraum von 72h wurden reine Sertolizellen (SK11), eine Mischkultur aus Sertolizellen und Peritubulärzellen (WL3) und reine Keimzellen (GC2) mit Testosteron in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die TGF- β Menge im Mediumüberstand dieser Zellen gemessen. Die Sertolizellen (SK11) sezernierten nur 20% so viel TGF- β 1 wie die Mischkultur (WL3) und sogar nur 3% so viel TGF- β 2 wie die Mischkultur (WL3). Die TGF- β 1 und TGF- β 2 Sekretion in reinen Sertolizellen (SK11) und der Mischkultur (WL3) konnte konzentrationsabhängig von Testosteron inhibiert werden. Dieser Effekt war durch eine antiandrogene Stimulierung mit Flutamid reversibel. Dies weist darauf hin, dass immortalisierte Sertolizellen einen funktionellen AR aufweisen. Interessanterweise maßen wir keine TGF- β 3 Sekretion in präpubertären Keimzellen (GC2) und der Mischkultur (WL3). Außerdem konnten wir keine TGF- β 2 Sekretion in Keimzellen (GC2) messen. Zur Bestätigung unserer Ergebnisse untersuchten wir zusätzlich die

TGF- β 2 Sekretion und die AR-Expression testikulärer Zellen an Hodenschnitten infertiler Männer mittels Immunhistochemie. Dabei beobachteten wir, dass es in den Hodenschnitten von Männern mit gestörter Spermatogenese zu einer signifikant stärkeren Anfärbung von TGF- β 2 in den testikulären Zellen kam, als in den Schnitten von Männern mit normaler Spermatogenese. Ein Zusammenhang zwischen der AR-Expression und TGF- β 2 Sekretion ließ sich mit dieser Methode nicht herstellen und wurde von uns mit anderweitiger Methodik noch nicht nachgegangen.

Damit konnten wir aufzeigen, dass TGF- β 1 und TGF- β 2 androgen reguliert sind. Somit ist ein Regulationsmechanismus während der Spermatogenese verstanden und kann als Hilfe für weitere Studien zur Klärung des gesamten Mechanismus Spermatogenese beitragen und den Weg zur Realisierung verbesserter Therapieoptionen bei männlicher Infertilität ebnen.

Summary

The regulation of spermatogenesis is based on a complex network of endocrine, paracrine and cellular mediators. The specific process of spermatogenesis is known in detail, but despite intensive research the exact regulation is not known yet. A lot of research teams tried to develop in vitro-systems to cultivate germ cells and therfor contribute towards clarifying the modulatory mechanics. But up to today it is not possible to seed germ cells to elongated spermatids or spermatozoon under in vitro conditions.

In previous studies from our research team as well as other research teams the hypothesis was drawn, that TGF- β and the apoptosis of germ cells, that is induced by TGF- β at the onset of puberty may have an essential role for spermatogenesis. In this study we tried to figure out, if the secretion of TGF- β might be regulated by androgen.

Over a period of 72h we stimulated sertoli cells (SK11), a mixture of sertoli cells and peritubular cells (WL3) and germ cells (GC2) with different concentrations of testosterone. Afterwards we measured the concentration of TGF- β in the medium of these cells via ELISA. Sertoli cells (SK11) secreted just 20% as much TGF- β 1 as the mixed culture (WL3) and just 3% as much TGF- β 2 as the mixed culture (WL3). The secretion of TGF- β 1 and TGF- β 2 in sertoli cells (SK11) as well as the mixed culture (WL3) was inhibited by testosterone depending on its concentration. This effect was reversible by stimulation with the antiandrogene flutamid. This shows, that immortalised sertoli cells have a functional AR. Interestingly there was no TGF- β 3 secretion detectable in the prepubertal germ cells (GC2) nor in the mixed culture (WL3). Furthermore we could not measure any secretion of TGF- β 2 in the germ cells (GC2). For further confirmation of our results we analysed the TGF- β 2 secretion and AR expression of testicular cells from microscopic cuts of infertile men via immunohistochemic. Thereby we observed, that the microscopic cuts of men with a

disturbed spermatogenesis had a significant stronger colouration of TGF- β 2 in testicular cells, than the ones with normal spermatogenesis. However we were not able to show a correlation between AR-Expression and TGF- β 2 secretion with this method and so far we did not use another method. In conclusion we were able to show, that TGF- β 1 and TGF- β 2 are regulated by androgen. Thus one mechanism of regulation during spermatogenesis is understood and can prove helpful for further studies, that involve the mechanism of spermatogenesis. Moreover it may be one step further regarding the improvement of different therapy options for male infertility.

LITERATURVERZEICHNIS

Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC (1999). Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol* 161:182-187

Afrakhte M, Moren A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermarck B, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P (1998). Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members. *Biochem Biophys Res Commun* 249:505-511

Ailenberg M, Tung PS, Fritz IB (1990). Transforming growth factor- β elicits shape changes and increases contractility of testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 42:499-509

Anthony CT, Kovacs WJ, Skinner MK (1989). Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with microassay that uses an affinity ligand. *J Endocrinol* 125:2628-2635

Bach J (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* 91:5-17

Benahmed M, Sordoillet C, Chauvin MA, de Peretti E, Morera AM (1989). On the mechanisms involved in the inhibitory and stimulating actions of transforming growth factor- β on porcine testicular steroidogenesis: an in vitro study. *Mol Cell Endocrinol* 67:155-164

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence of stage-dependent expression and regulation by androgens. *J Endocrinol* 135:1227-1234

- Brodin G, tenDijke P, Funa K, Heldin CH, Landstrom M (1999). Increased Smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 59:2731-2738
- Bruckheimer EM, Kyprianou N (2001). Dihydrotestosterone enhances transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hormone-sensitive prostate cancer cells. *Endocrinology* 142:2419-2426
- Bubulya A, Wise SC, Shen XQ, Burmeister LA, Shemshedini L (1996). C-Jun can mediate androgen receptor-induced transactivation. *J Biol Chem* 271:24583-24589
- Byers S, Pelletier RM, Suarez-Quian C (1993). Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press; 431-446
- Chambaz EM, Souchelnitskiy S, Pellerin S, Defaye G, Cochet C, Feige J (1996). Transforming growth factor β s: a multifunctional cytokine family. *Horm Res* 45:222-226
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6876-6881
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letartell M (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030
- Cheng CY, Mruk D (2002). Cell junction dynamics in the testis: their implication in Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82:825-874

Chin BY, Petrache I, Choi AM, Choi ME (1999). Transforming growth factor β 1 rescues serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *J Biol Chem* 274:11362-11368

Chipuk JE, Cornelius SC, Pultz NJ, Jorgensen JS, Bonham MJ, Kim SJ, Danielpour D (2001). The androgen receptor represses transforming growth factor- β signaling through interaction with Smad3. *J Biol Chem* 277:1240-1247

Damestoy A, Perrard MH, Vigier M, Sabido O, Durand P. Transforming growth factor beta-1 decreases the yield of the second meiotic division of rat pachytene spermatocytes in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 3:22

De Caestecker M (2004). The transforming growth factor- β super-family of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:1-11

De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1327-1332

De Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitisch H, Wrann M, Schusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E (1987). Complementary DNA for human glioblastoma-derived factor- β family. *EMBO J* 6:3673-3677

De Kretser DM, Kerr JB (1988). The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 837-932

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV (1985). Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316:701-705

- Derynck R, Zhang Y, Feng XH (1998). Smads: Transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95:737-740
- Desai KV, Kondaiah P (2000). Androgen ablation results in differential regulation of transforming growth factor-beta isoforms in rat male accessory sex organs and epididymis. *J Mol Endocrinol* 24:253-260
- Donovan PJ (1994). Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr Top Dev Biol* 29:189-225
- Feng XH, Derynck R (2005). Speciality and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693
- Fronsdal K, Engedal N, Slagsvold T, Saatcioglu F (1998). CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem* 273:31853-31859
- Galena HJ, Pillar AK, Turner C (1974). Progesterone and androgen receptors in non-flagellate germ cells of the rat testis. *J Endocrinol* 99:223-237
- Gautier C, Levacher C, Saez JM, Habert R (1997). Transforming growth factor β 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 131:21-30
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58:685-704
- Gittes RF (1991). Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 324:236-245
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein1: Structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:878-883

Grootegoed JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FF, Van der Molen HJ (1977). Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 9:159-167

Guo Y, Kyprianou N (1999). Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 59:1366-1371

Guyton AC, Hall JE, editors (2000). *Textbook of Medical Physiology*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp 925-926

Haagmans BL, Hoogerbrugge JW, Themmen APN, Teerds KJ (2003). Rat testicular germ cells and sertoli cells release different types of bioactive transforming growth factor beta in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 1:3

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-353

Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12:186-197

Hayashi H, Abdollah S, Qui Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone Jr MA, Wrana JL, Falb D (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signalling. *Cell* 89:1165-1173

Hayes SA, Zarneger M, Sharma M, Yang F, Peehl DM, tenDijke P, Sun Z (2001). Smad3 represses androgen receptor-mediated transcription. *Cancer Res* 61:2112-2118

Hofmann MC, Hess RA, Goldberg E, Millan JL (1994). Immortalized germ cells undergo meiosis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5533-5537

Hsiao PW, Chang C (1999). Isolation and characterization of ARA160 as the first androgen receptor N-terminal-associated coactivator in human prostate cells. *J Biol Chem* 274:22373-22379

Huang Y, Hutter D, Liu Y, Wang X, Sheikh MS, Chan AM, Holbrook NJ (2000). Transforming growth factor- β 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities. *J Biol Chem* 275:18234-18242

Ignotz R, Massague J (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389:622-626

Itoh N, Patel U, Cupp AS, Skinner MK (1998). Development and hormonal regulation of transforming growth factor- β 1 (TGF β 1), -2, and -3 gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells: epidermal growth factor and TGF β interactions. *Endocrinology* 139:1378-1388

Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH (2002). TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 4:51-58

Johnston DS, Russell LD, Friel PJ, Griswold MD (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *J Endocrinol* 142:2405-2408

Kadmas JL, Beckerle MC (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:920-931

Kang HY, Lin HK, Hu YC, Yeh S, Huang KE, Chang C (2001). From transforming growth factor- β signaling to androgen action: Identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3018-3023

Kang HY, Huang KE, Chang SY, Ma WL, Lin WJ, Chang C (2002). Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 277:43749-43756

Kerr JB, Savage GN, Millar M, Sharpe RM (1993). Response of the seminiferous epithelium of the rat testis to withdrawal of androgen: evidence for direct effect upon intercellular spaces associated with Sertoli cell junctional complexes. *Cell Tissue Res* 274:153-161

Keski-Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ Jr, Moses HL (1987). Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem* 33:95-107

Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Aumüller G (2000). Transforming growth factor- β 2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology* 141:3679-3686

Konrad L, Keilani MM, Laible L, Nottelmann U, Hofmann R (2006). Effects of TGF- β 2 and a specific antagonist on apoptosis of immature rat male germ cells in vitro. *Apoptosis* 11:739-748

Konrad L, Scheiber JA, Völck-Badonin E, Keilani MM, Laible L, Brandt H, Schmidt A, Müller G, Hofmann R (2007). Alternative splicing of TGF- β 2 and their high-affinity receptors T β RI, T β RII and T β RIII (betaglycan) reveal new variants in human prostatic cells. *BMC Genomics* 8:318

Kuiper GG, Brinkmann AO (1995). Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor: detection of a hormone-induced phosphopeptide. *Biochemistry* 34:1851-1857

Kyprianou N, Isaacs JT (1988). Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 123:2124-2131

Kyprianou N, Isaacs JT (1989). Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Mol Endocrinol* 3:1515-1522

Lawrence DA, Pircher R, Kryce-Martinerie C, Jullien P (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J Cell Physiol* 121:184-188

Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55:548-573

Lording DW, De Kretser DM (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* 29:261-269

Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2001). Transforming growth factor- β 3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* 142:1865-1877

Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2003a). Transforming growth factor β 3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod* 68:1597-1612

Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2003b). TGF- β s: Their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. *Int J Androl* 26:147-160

MacConell LA, Leal AM, Vale WW (2002). The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: Implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *Endocrinology* 143:1066-1075

Maire M, Florin A, Kaszas K, Regnier D, Contard P, Tabone E, Mauduit C, Bars R, Benahmed M (2005). Alteration of transforming growth factor- β signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption. *Endocrinology* 146:5135-5143

Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791

Massague J, Wotton D (2000). Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745-1754

Mc Lachlan RI, Wreford NG, Meachem SJ, De Kretser DM, Robertson DM (1994). Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biol Reprod* 51:945-955

Memon MA, Anway MD, Covert TR, Uzumcu M, Skinner MK (2008). Transforming Growth Factor Beta (TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) Null-Mutant Phenotypes in Embryonic Gonadal Development. *Mol Cell Endocrinol* 294:70-80

Merkle W, Diederichs W, Diemer W, Frankenschmidt A, Graff HJ, Günthert EA, Haupt G, Kämmerling M, Ludwig G, Melchior H, Neubauer R, Schroeder-Printzen I (1997). *Urologie: Duale Reihe*. Stuttgart: Hippokrates Verlag, ISBN 3-7773-1116-2:261-262

Monesi V (1962). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J Cell Biol* 14:1-18

Monesi V (1965). Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp Cell Res* 39:197-224

Moses HL, Tucker RF, Leof EB, Coffey RJ Jr, Halper J, Shipley GD (1985). Type- β transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. In: Feramisco J,

Ozanne B, Stiles C (eds) *Cancer Cells*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, vol 3:65-71

Mruk DD, Cheng CY (2000). Sertoli cell proteins in testicular paracrine. In: Jegou B, Pineau C (eds.), *Testis, Epididymis and technologies in the year 2000*. Heidelberg: Springer-Verlag; 197-228

Mueller OM, Korach KS (2001). Immortalized testis cell lines from estrogen receptor (ER) α knock-out and wild-type mice expressing functional ER α or ER β . *J Androl* 22:652-664

Mullaney BP, Skinner MK (1993). Transforming growth factor- β (β 1, β 2, and β 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: Potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 7:67-76

Murphy-Ullrich JE, Poczatek M (2000). Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: Mechanism and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:59-69

- Nargolwalla C, Mc Cabe D, Fritz IB (1990). Modulation of levels of messenger RNA for tissue-type plasminogen activator in rat Sertoli cells, and levels of messenger RNA for plasminogen activator inhibitor in testis peritubular cells. *Mol Cell Endocrinol* 70:73-80
- Narula A, Ma E, Kroeger J, Goldberg E, Woodruff TK (2002). Smad4 overexpression causes germ cell ablation and leydig cell hyperplasia in transgenic mice. *Am J Pathol* 161:1723-1734
- O'Donnell L, Mc Lachlan RI, Wreford NG, Robertson DM (1994). Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* 135:2608-2614
- Olaso R, Pairault C, Boulogne B, Durand P, Harbert R (1998a). Transforming growth factor β 1 and β 2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *J Endocrinol* 139:733-40
- Olaso R, Pairault C, Habert R (1998b). Expression of type I and II receptors for transforming growth factor β in the adult rat testis. *Histochem Cell Biol* 110:613-618
- Panthou P, Barbey P, Thiebot B, Bocquet J (1994). Effects of transforming growth factor- β 1, interleukin-1 α and interleukin-6 on rat Sertoli cell proteoglycan synthesis. *Biochem Mol Biol Int* 34:603-612
- Peets EA, Henson MF, Neri R (1974). On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (α - α - α -trifluoro-2-methyl-4'-nitro-*m*-propionotoluidide) in the rat. *Endocrinology* 94:532-540
- Pentikainen V, Dunkel L, Erkkila K. Male germ cell apoptosis. *Endocr Dev* 2003:56-80

Perey B, Clermont Y, Leblond CP (1961). The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 108:47-77

Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Exp Med* 165:251-256

Prepin J, Le Vigouroux P (1997). Inhibition by TGF- β 1 of the in vitro thymulin-stimulated proliferation of gonocytes from fetal rat testes. *Reprod Nutr Dev* 37:203-206

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wison EM, French FS (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16:271-321

Roberts AB (1998). Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 24:111-119

Roberts AB, Sporn MB (1985). Transforming growth factors. *Cancer Surv* 4:683-705

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16:2262-2270

Roelen BA, Cohen OS, Raychowdhury MK, Chadee DN, Zhang Y, Kyriakis JM, Alessandrini AA, Lin HY (2003). Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:823-830

- Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W, Knaus P (2001). Type III TGF- β receptor-independent signalling of TGF- β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor. *EMBO J* 20:480-490
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990). Mammalian Spermatogenesis. In: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL, 1-40
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *PNAS* 92:2572-2576
- Santamaria L, Martin R, Codesal J, Ramirez R, Paniagua R (1995). Immunohistochemical quantitative study of peritubular lamina propria after induction of testicular atrophy induced by epinephrine. *Int J Androl* 18:295-306
- Schneikert J, Peterziel H, Defossez PA, Klocker H, Launoit Y, Cato AC (1996). Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 271:23907-23913
- Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *J Endocrinol* 138:1259-1266
- Shin I, Bakin AV, Rodeck U, Brunet A, Arteaga CL (2001). Transforming growth factor β enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell* 12:3328-3339
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 136:5311-5321

Skinner MK, Moses HL (1989). Transforming growth factor β gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol* 3:625-634

Sneddon SF, Walther N, Saunders PTK (2005). Expression of androgen and estrogen receptors in Sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology* 146:5304-5312

Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R (1997). Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* 99:2365-2374

Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J (1998). Extracellular matrix-associated transforming growth factor- β : role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 75:87-134

Teerds KJ, Dorrington JH (1993). Localization of transforming growth factor β 1 and β 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod* 48:40-45

ten Dijke P, Hansen P, Iwata KK, Pieler C, Foulkes JG (1988). Identification of a new member of the transforming growth factor type β gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4715-4719

ten Dijke P, Hill CS (2004). New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29:265-273

Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, Lebrun JJ (2002). Activin/TGF- β induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 4:963-969

van der Poel HG (2005). Androgen receptor and TGF β 1/Smad signaling are mutually inhibitory in prostate cancer. *Eur Urol* 48:1051-1058

- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. J Endocrinol 134:2307-2316
- Walther N, Jansen M, Ergün S, Kascheike B, Ivell R (1996). Sertoli cell lines established from *H-2K^b-tsA58* transgenic mice differentially regulate the expression of cell-specific genes. Exp Cell Res 225:411-421
- Wang H, Song K, Sponseller TL, Danielpour D (2004). Novel function of the androgen receptor-associated protein 55/Hic-5 as a negative regulator of smad3 signaling. J Biol Chem 280:5154-5162
- Wang Y, Lui WY (2009). Opposite effects of interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta2 induce stage-specific regulation of junctional adhesion molecule-B gene in Sertoli cells. Endocrinology 150:2404-2412
- Weinbauer GT, Wessels J (1999). 'Paracrine' control of spermatogenesis. Andrologia 31:249-262
- Wikstrom P, Westin P, Stattin P, Damber JE, Bergh A (1999). Early castration-induced upregulation of transforming growth factor beta1 and its receptors is associated with tumor cell apoptosis and a major decline in serum prostate-specific antigen in prostate cancer patients. Prostate 38:268-277
- Wilson EM, French FS (1976). Binding properties of androgen receptors: evidence for identical receptors in rat testis, epididymis and prostate. J Biol Chem 251:5620-5629
- Wilson JD (1992). Syndromes of androgen resistance. Biol Reprod 46:68-76
- Wright WW, Frankel AI (1980). An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. J Endocrinol 107:314-318

Xia W, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY (2006). Differential interactions between transforming growth factor-beta3/TbetaR1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. *J Biol Chem* 281:16799-16813

Yeh S, Chang C (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5517-5521

Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13498-13503

Zatelli MC, Rossi R, degli Uberti EC (2000). Androgen influences transforming growth-factor beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:847-852

Zhang Y, Feng XH, Derynck R (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta induced transcription. *Nature* 394:909-913

Zhang S (1999). *An Atlas of Histology*. Springer-Verlag New York, Inc. ISBN 0-387-94954-2

Zhang M, Latham DE, Delaney MA, Chakravarti A (2005). Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 24:2474-2482

Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17718-17723

Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 245:509-518

Zhu ML, Partin JV, Bruckheimer EM, Strup SE, Kyprianou N (2008). TGF- β signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells. *Prostate* 68:287-295

ANHANG

Meine akademischen Lehrer im Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität zu Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Cetin, Czubayko, Daut, Dominguez, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Geus, Gudermann, Hasilik, Hegele, Hertl, Hofmann, Hoyer, Klose, Koolmann, Kretschmer, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Renz, Rothmund, Röhm, Röper, Schütz, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Lutz Konrad dafür danken, dass er mir zum einen die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe an diesem Thema arbeiten zu dürfen. Zum anderen möchte ich ihm vor allem für die außerordentliche Geduld danken. Die Betreuung bei ihm war besonders engagiert. Bei etwaigen Fragen war er immer ansprechbar und konnte mit guten Ratschlägen das Projekt in die richtige Richtung lenken. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Hofmann für die Möglichkeit, die Laborräumlichkeiten nutzen zu dürfen.

Außerdem danke ich Frau Nottelmann, die mich kurz vor ihrer Verabschiedung in die Rente, in den Laboralltag eingearbeitet hat und mir den Einstieg somit sehr erleichtert hat.

Ich danke ganz herzlich meinem Labormitarbeiter Jonas Scheiber, der mich in die Methodik eingeführt hat, bei Unklarheiten immer eine Antwort parat hatte und bei bestimmten Tiefpunkten eine moralische Stütze war. Ebenso danke ich meiner Laborpartnerin und Freundin Lena Schwarz. Mit ihr hat das Arbeiten im Labor doppelt so viel Spaß gemacht und sie hat mich unterstützt, wo sie nur konnte.

Ich danke Prof. Dr. Bergmann von der Vet Medizin Gießen für die Bereitstellung der Gewebeschnitte und ich danke allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Klinikum Marburg, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Mutter und meinem Stiefvater für die Geduld und Unterstützung in all den Jahren danken und auch dafür niemals Druck auf mich ausgeübt zu haben. Ohne die Beiden wäre ich nicht die Person, die ich heute bin. Ein allerletztes Dankeschön geht an alle meine Freunde, die mich vor allem im Schreibprozess ertragen mussten und mit ihren Tipps und anspornenden Worten zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.